

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000年12月14日 (14.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/75314 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, 5/10, C07K 14/715,
16/28, C12P 21/02, G01N 33/53, 33/566

〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03556

(72) 発明者: および

(22) 国際出願日: 2000年6月1日 (01.06.2000)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 前田正嗣 (MAEDA, Masatsugu) [JP/JP], 矢口紀子 (YAGUCHI, Noriko) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

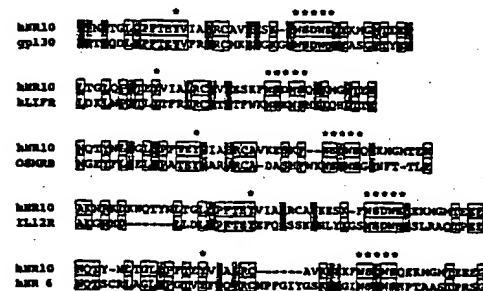
(30) 優先権データ:
特願平11/155797 1999年6月2日 (02.06.1999) JP
特願平11/217797 1999年7月30日 (30.07.1999) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL HEMOPOIETIN RECEPTOR PROTEIN NR10

(54) 発明の名称: 新規ヘモポエチン受容体蛋白質、NR10



(57) Abstract: A novel hemopoietin receptor gene (NR10) is successfully isolated based on a sequence anticipated by extracting a conserved motif from the amino acid sequence of a known hemopoietin receptor. It is considered that NR10 occurs as a transmembrane protein and soluble protein and the expression of the transmembrane receptor gene is detected in a tissue containing hematopoietic cells. NR10, which is a novel hemopoietin receptor molecule participating in immunoregulation and hematopoietic cell regulation *in vivo*, is useful in searching a novel hematopoietic factor capable of functionally binding to the receptor and developing remedies for diseases concerning immune and hematopoietic systems.

(57) 要約:

既知のヘモポエチン受容体のアミノ酸配列から保存されているモチーフを抽出し、予測した配列をもとに新規なヘモポエチン受容体遺伝子 (NR10) を単離することに成功した。NR10 には、細胞膜貫通型と可溶型の2つ型が存在すると考えられ、細胞膜貫通型受容体遺伝子は造血系細胞を含む組織で発現が検出された。NR10 は生体免疫調節、造血細胞調節に関与する新規なヘモポエチン受容体分子であり、同受容体と機能結合し得る新規造血性因子の検索や、免疫・造血系関連疾患の治療薬の開発に有用である。

WO 00/75314 A1



RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開書類:

— 国際調査報告

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

明細書

新規ヘモポエチン受容体蛋白質、NR 10

技術分野

本発明は新規ヘモポエチン受容体蛋白質、それをコードする遺伝子、それらの製造方法及び用途に関する。

背景技術

種々の細胞の増殖分化、あるいは分化成熟した細胞の機能の賦活化さらには細胞死に關与する体液性因子として数多くのサイトカインの存在が知られている。これらのサイトカインにはそれぞれ特異的な受容体が存在し、これらの受容体は構造上の類似性から幾つかのファミリーに分類されている (Hilton D.J., in "Guidebook to Cytokines and Their Receptors" edited by Nicola N.A. (A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press), 1994, p8-16)。

一方、受容体間の類似性と比較するとサイトカイン同士の一次構造上の相同性は低く、同一の受容体ファミリーに属するサイトカインメンバーの間でさえアミノ酸レベルでの顕著な相同性は認められない。このことは個々のサイトカインの機能の特異性を説明すると同時に、個々のサイトカインにより誘導される細胞の反応の類似性を説明する。

上記サイトカイン受容体ファミリーの代表的なものとして、チロシンキナーゼ受容体、ヘモポエチン受容体、腫瘍壊死因子(TNF)受容体、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)受容体の各ファミリーが挙げられ、それぞれのファミリーで異なるシグナル伝達系の関与が報告されている。これらの受容体ファミリーのうち、特にヘモポエチン受容体ファミリーの多くは血液細胞あるいは免疫担当細胞に発現しており、そのリガンドであるサイトカインはしばしば造血因子あるいはイン

ターロイキンと称される。これら造血因子、あるいはインターロイキン類のあるものは血流中に存在し全身的な造血あるいは免疫機能の体液性調節に関与していると考えられる。

このことは他のファミリーに対応するサイトカインがしばしば局所での調節にのみ関与していると考えられる点とは対照的で、これらヘモポエチン類の一部のものはホルモン様因子と捉えることが可能であり、また逆に代表的なペプチド性ホルモンである成長ホルモン、プロラクチンあるいはレプチンの受容体もヘモポエチン受容体ファミリーに属する。上記ホルモン様の全身性調節様式からこれらのヘモポエチン類を投与することによる種々の疾患の治療への応用が期待される。

事実、数多いサイトカイン類の中で臨床応用が行われているのは、エリスロポエチン、G-CSF、GM-CSF、IL-2 であり、また現在臨床応用に向けた検討が行われている、IL-11、LIF、IL-12 に加えて上記ペプチドホルモン類の成長ホルモン、プロラクチンを併せて考えると、上記各種受容体ファミリーのうちヘモポエチン受容体に結合する新規サイトカインを探索することにより、より高い確率で臨床応用可能なサイトカインを見出すことが可能と考えられる。

上に述べた様にサイトカイン受容体はファミリーメンバー間で構造上の類似性を有している。この類似性を利用して新規受容体を発見する試みは数多く行われており、特にチロシンキナーゼ受容体に関しては、その触媒部位の高度に保存された配列を利用して既に数多くの受容体がクローニングされている(Matthews W. et al., Cell, 1991, 65 (7) p1143-52)。これに対してヘモポエチン受容体はその細胞質領域にチロシンキナーゼの様な酵素活性ドメインを有しておらず、そのシグナル伝達は細胞質中に遊離状態で存在する別のチロシンキナーゼ蛋白との会合を介して行われることが知られている。

これらの細胞質性チロシンキナーゼ (JAK キナーゼ) との受容体上の結合部位はファミリーメンバー間で一応保存されてはいるものの、その相同性はあまり高くない (Murakami M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1991, 88, 11349-1135

- 3 -

3)。一方、これらヘモポエチン受容体を最もよく特徴付ける配列はむしろ細胞外領域に存在し、特に Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (Xaa は任意のアミノ酸) の 5 アミノ酸から成るモチーフは殆ど全てのヘモポエチン受容体に保存されており、この配列を利用した新規ファミリーメンバーの探索により新規受容体を取得することが期待される。事実、これまでに IL-11 受容体 (Robb, L. et al., J. Biol. Chem. 271 (23), 1996, 13754-13761)、レプチン受容体 (Gainsford T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93 (25) p14564-8) 及び IL-13 受容体 (Hilton, D. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93 (1) p497-501) がこのアプローチにより同定されている。

発明の開示

本発明は、新規ヘモポエチン受容体蛋白質、それをコードする DNA を提供する。本発明はまた、該 DNA が挿入されたベクター、該 DNA を保持する形質転換体、該形質転換体を利用した組換え蛋白質の製造方法を提供する。本発明はさらに、該蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明者らは、これまでに、Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser モチーフ (WS モチーフ) をコードするオリゴヌクレオチドをプローブに用いてブラークハイブリダイゼーションあるいは RT-PCR 等の方法により新規受容体の探索を試行してきた。しかし、このモチーフをコードするオリゴヌクレオチド tggag(t/c)nnntggag(t/c)(n は任意の塩基) が 15 塩基対と短いこと、さらには g/c 含量が高い等の理由から通常のハイブリダイゼーションの実験条件下で厳密に 15 塩基が完全にハイブリダイズしたものだけを選別することは極めて困難であった。

また、比較的広範に分布しかつ発現量も高いと考えられる各種コラーゲンを初めとするヘモポエチン受容体以外の蛋白をコードする cDNA 中にも類似の配列が含まれており、これらの原因により上記ブラークハイブリダイゼーションあるいは RT-PCR によるスクリーニングは極めて効率の悪いものであった。

これらの問題を解決するために、上記 WS モチーフ以外の部位において、ヘモポエチン受容体ファミリーに保存されているモチーフを検討した。その結果、同ファミリーの細胞外領域において WS モチーフより 13~27 アミノ酸上流に位置するチロシン残基、あるいはヒスチジン残基が高い確立で保存されており、さらに、その Tyr/His 残基から C 末端方向の 6 アミノ酸において、高頻度に出現するコンセンサス配列を検討した結果、(Tyr/His)-Xaa-(Hydrophobic/Ala)-(Gln/Arg)-Hydrophobic-Arg といったアミノ酸配列（以下 YR モチーフと称する）を見出すことが可能であった。しかしながら、この YR モチーフは必ずしも完全なコンセンサス配列と断定できるものではなく、また、このモチーフをコードする塩基配列の組合わせは複雑性に富んでいる。従って、現実的なスクリーニングの手段となるハイブリダイゼーションのためのプローブや、あるいは RT-PCR を目的とするプライマーとして、このアミノ酸配列の全てをコード可能なオリゴヌクレオチドを合成、且つ供することは事実上不可能に近い。

そこで、上記 2 種類のモチーフをプローブとして利用する具体的な新規ヘモポエチン受容体ファミリーメンバーの検索手段を検討した結果、双方のモチーフ配列を共に含むように、既知ヘモポエチン受容体を断片化した部分アミノ酸配列を質問式 (query) として用いる、コンピュータ上でのデータベース検索が妥当であると判断した。実際に GenBank の gss、及び htgs データベースに対する TblastN 検索を、複数の既知ヘモポエチン受容体の部分アミノ酸配列を質問式として用いて繰り返し実施した結果、何れの場合においても、多数の疑陽性クローンが得られた。次に上記検索で得られたクローンについて、プローブ配列周辺の塩基配列をアミノ酸配列に変換して既知のヘモポエチン受容体のアミノ酸配列と比較する事により、同受容体ファミリーメンバーをコードすると考えられる遺伝子を選別した。以上の検索により唯一、1 クローンの新規ヘモポエチン受容体遺伝子をコードし得ると推測されるヒトゲノム配列を同定し、この遺伝子を NR10 と命名した。次に、得られた塩基配列をもとにして、特異的なオリゴヌクレオチドプライマ

一を設計した。これらプライマーを利用した 5'-RACE 法、及び 3'-RACE 法をヒト胎児肝細胞、及びヒト胎盤 cDNA ライブラリーを鋳型としておこなうことにより、最終的に 652 アミノ酸からなる細胞膜貫通型受容体をコードする完全長 cDNA、NR10.1 を単離し、その全塩基配列を決定した。同時に 3'-RACE の産物においてスプライス変異体と推定される cDNA クローン、NR10.2 の単離にも成功した。その塩基配列を決定した結果、NR10.2 は 252 アミノ酸からなる可溶性受容体様蛋白をコードすることが可能であることを認めた。NR10.1 は一次構造上、細胞外領域に他のファミリーメンバー間で保存されているシステイン残基、プロリンに富んだモチーフ、WSXWS モチーフ、細胞内領域にシグナル伝達に関与すると考えられる box1 モチーフ、等がよく保存されており典型的なヘモポエチン受容体をコードしていると考えられた。

その後、さらに NR10.1、及び NR10.2 のそれぞれに特異的なプライマーセットを用いた RT-PCR 法を、各ヒト臓器由来の mRNA に対しておこない、当該遺伝子の発現組織を検索すると共に、同遺伝子の各ヒト臓器における発現分布、及び、発現様態の解析をおこなった。RT-PCR によって増幅された標的遺伝子は、NR10.1 及び NR10.2 それぞれに特異的な cDNA 断片をプローブとして用いたサザンブロットティング法を実施することで確認をおこない、それが非特異的な増幅である可能性を否定すると同時に、RT-PCR 産物の定量的評価をおこなった。その結果、解析した全ての臓器において構成的に一定量の発現分布が認められた NR10.2 遺伝子に対し、NR10.1 は成人心臓、胎盤、精巣、胸腺、末梢白血球において強い発現を示し、さらに脾臓、骨髓、前立腺、卵巣、膵臓、肺において弱い発現が検出されるなど、その遺伝子発現を認める臓器、及び組織は制限されるものであった。

また、本発明者等は、NR10.1 の完全長 ORF の単離を目的とする PCR クローニングにおいて、NR10.1 の僅か 1 塩基が欠損した塩基配列を有し、662 アミノ酸からなる細胞膜貫通型受容体蛋白をコードする cDNA クローン、NR10.3 を単離した。NR10.3 は、NR10.1 と構造的に近似していることから、NR10.1 と同等の機能を有し

ていると考えられた。

以上のような NR10 の特性から、NR10 は生体免疫調節、或いは造血細胞調節に関与する新規なヘモポエチン受容体分子と推定され、同受容体と機能結合し得る新規造血性因子の検索に、同遺伝子を利用することは極めて有用であると考えられる。

すなわち、本発明は、新規なヘモポエチン受容体およびそれらの遺伝子、ならびにそれらの製造および利用に関し、より具体的には、

(1) 下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1、3、または16かに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる、配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1、3、または16に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(2) 配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA、

(3) (1) または (2) に記載の DNA が挿入されたベクター、

(4) (1) または (2) に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体、

(5) (1) または (2) に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド、

- 7 -

(6) (4)に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(5)に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (5)に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (5)に記載の蛋白質またはその部分ペプチドに被験試料を接触させる工程、および

(b) (5)に記載の蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) (5)に記載の蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(8) (5)に記載の蛋白質に結合する抗体、

(9) (8)に記載の抗体と、(5)に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含む、(5)に記載の蛋白質の検出又は測定方法、および

(10) 配列番号：1、3または16に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、を提供するものである。

本発明は、新規ヘモポエチン受容体「NR10」を提供する。GenBank データベース解析、および5'-RACE 及び3'-RACE による解析の結果から、本発明者らは新規ヘモポエチン受容体遺伝子 NR10 を同定し単離することに成功した。NR10 の転写産物には、少なくとも2種のスプライス変異体の存在が確認された。このうち、細胞膜貫通型受容体蛋白をコードする cDNA クローンを NR10.1 とし、他方、252 アミノ酸からなる可溶性受容体様蛋白をコードすると考えられる cDNA クローンを NR10.2 とした。また、本発明者等は、NR10.1 cDNA の完全長 ORF の単離を目的とする PCR クローニングにおいて、662 アミノ酸からなる細胞膜貫通型受容体蛋

白をコードする cDNA クローンの完全長 ORF の単離に成功し、この cDNA クローンを NR10.3 と命名した。

NR10.1 cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、該 cDNA によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2 に示す。また、NR10.2 cDNA の塩基配列を配列番号：3 に、該 cDNA によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4 に示す。また、NR10.3 cDNA の塩基配列を配列番号：16 に、該 cDNA によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：17 に示す。

NR10.1 に対して NR10.3 cDNA クローンは、終止コドン近傍に存在するアデニン基クラスターにおける、僅か 1 塩基の欠損が認められ、これによって発生したフレームシフトに起因するアミノ酸配列読み枠の相違を示す。従って、これら両クローンの相違は、スプライシング変異体であることに基づく転写産物の相違ではない。また、その 1 塩基の欠損以外においては、NR10.1 と NR10.3 cDNA クローンの相違は認めれない。細胞外領域においては、双方共に全く同一であるため両者は同様の立体構造を保有し、さらに同一の特異的リガンドを認識すると考えられる。一方、細胞内領域においては、細胞膜貫通領域直下に存在する Box1 モチーフ（数個の塩基性アミノ酸と複数の疎水性アミノ酸に続く、Pro-Xxx-Pro 配列）を保有していることから、JAK キナーゼの結合が予測される。従って、これらがコードする蛋白質は、機能的に同等であること推測される。

RT-PCR 法を用いて各ヒト臓器における遺伝子発現解析を実施した結果、解析した全ての臓器において構成的に一定量の発現分布が認められた NR10.2 遺伝子に対し、NR10.1 は成人心臓、胎盤、精巣、胸腺、末梢白血球において強い発現を示し、さらに脾臓、骨髓、前立腺、卵巣、膵臓、肺において弱い発現が検出されるなど、その遺伝子発現を認める臓器、及び組織は制限されるものであった。以上ことから、NR10 は新規造血因子受容体をコードするものと推定される。

上記 NR10 タンパク質には、医療への応用が考えられる。NR10.1 が胸腺、末梢白血球及び脾臓に発現していることから未知の造血因子の受容体である可能性が

示唆される。従って、NR10 タンパク質はこの未知の造血因子を得るための有用な材料を提供するものと考えられる。また、NR10 分子と機能結合し得るアゴニスト、或いはアンタゴニストの検索を、ペプチドライブラリー、または合成化学材料に対しておこない、単離同定することも考えられる。さらに、NR10 分子に機能結合する新規分子、及び NR10 分子機能を制限し得る特異的抗体の検索による、生体免疫応答制御や造血細胞制御といった臨床応用が期待される。

また、NR10 の発現はこれら造血組織中の限られた細胞集団に特異的に発現している可能性が想定され、この細胞集団を分離する手段として抗 NR10 抗体は有用である。この様にして分離された細胞集団は細胞移植療法への応用が可能である。さらに抗 NR10 抗体は白血病を初めとした疾患の病型診断あるいは治療への応用も期待される。

一方、NR10 蛋白質の細胞外ドメインを含む可溶性蛋白質、あるいは NR10 のスプライス変異体である NR10.2 はデコイ型受容体として NR10 リガンドの阻害剤としての利用が想定され、NR10 が関与する白血病を初めとする疾患の治療への応用が期待できる。

本発明は、NR10 タンパク質と機能的に同等なタンパク質を包含する。このようなタンパク質には、例えば、ヒト NR10 タンパク質に対応する他の生物のホモログタンパク質やヒト NR10 タンパク質の変異体が含まれる。本発明において「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が、上記 NR10 タンパク質と同等の生物学的活性を有することを指す。生物学的活性としては、例えば、膜結合型または可溶性の造血因子受容体蛋白質活性である。

あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、

Kramer W, and Fritz HJ(1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492、Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) などを用いて、ヒト NR10 タンパク質のアミノ酸に適宜変異を導入することによりヒト NR10 タンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、ヒト NR10 タンパク質のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、ヒト NR10 タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。

本発明の NR10 蛋白質と機能的に同等な蛋白質としては、具体的には、配列番号：2、4、または 17 に示されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が欠失したもの、配列番号：2、4、または 17 に示されるアミノ酸配列に 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が付加したもの、配列番号：2、4、または 17 に示されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一字標記を表す)。

なお、あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンバ

ク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

ヒト NR10 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号: 2、4、または 17) に 1 又は複数個のアミノ酸残基が付加されたタンパク質としては、例えば、ヒト NR10 タンパク質を含む融合タンパク質が挙げられる。融合タンパク質は、ヒト NR10 タンパク質と他のペプチド又はタンパク質とが融合したものであり、本発明に含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明のヒト NR10 タンパク質をコードする DNA と他のペプチド又はタンパク質をコードする DNA をフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチド又はタンパク質としては、特に限定されない。

本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドとしては、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6 個の His (ヒスチジン) 残基からなる 6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒト c-myc の断片、VSV-GP の断片、p18HIV の断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T 抗原の断片、lck tag、 α -tubulin の断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明のタンパク質との融合に付される他のタンパク質としては、例えば、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) 等が挙げられる。

市販されているこれらペプチドまたはタンパク質をコードする DNA を本発明のタンパク質をコードする DNA と融合させ、これにより調製された融合 DNA を発現させることにより、融合タンパク質を調製することができる。

また、あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ヒト NR10 タンパク質をコードする DNA 配列 (配列番号: 1、3、または 16) もしくはその一部を基に、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA からヒト NR10 タンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することも通常行いうることである。このように、ヒト NR10 タンパク質をコードする DNA もしくはその一部からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、ヒト NR10 タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、ヒト以外の哺乳動物のホモログ (例えば、サル、マウス、ラット、ウサギ、ウシの遺伝子がコードするタンパク質) が挙げられる。ヒト NR10 タンパク質をコードする DNA と相同性の高い cDNA を、動物から単離する場合、特に心臓、胎盤、精巣などの組織を用いることが好ましいと考えられる。

ヒト NR10 タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を単離するためのストリンジентなハイブリダイゼーションの条件としては、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば、低ストリンジентな条件が挙げられる。低ストリンジентの条件とは、例えば 42°C、2×SSC、0.1%SDS が挙げられ、好ましくは 50°C、2×SSC、0.1%SDS である。またより好ましくは、高ストリンジентな条件が挙げられる。高ストリンジентな条件とは、例えば 65°C、2×SSC 及び 0.1%SDS が挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA を得ることができる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度以外にも塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

また、ハイブリダイゼーションにかえて、ヒト NR10 タンパク質をコードする D

NA (配列番号：1、3、または16) の配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を利用して目的の DNA を単離することも可能である。

これらハイブリダイゼーション技術または遺伝子増幅技術により単離される DNA がコードするヒト NR10 タンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、ヒト NR10 タンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明のタンパク質には、ヒト NR10 蛋白質と機能的に同等であり、かつ配列番号：2、4、または17に示されるアミノ酸配列と高い相同性を有する蛋白質も含まれる。高い相同性とは、通常、70%以上の相同性、好ましくは80%以上の相同性、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。タンパク質の相同性を決定するには、文献 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

本発明のタンパク質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られたタンパク質が、本発明のヒト NR10 タンパク質 (配列番号：2、4、または17) と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の蛋白質を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の蛋白質のアミノ酸配列の N 末端にメチオニン残基が付加される。また、真核細胞、例えば哺乳動物細胞で発現させた場合、N 末端のシグナル配列は除去される。本発明の蛋白質はこのような蛋白質も包含する。

例えば、文献 (Von Heijne, G. Nucleic Acids Research (1986) 14, 4683-4690) に記載の方法に基づいて、本発明の蛋白質を解析した結果、シグナル配列は配列番号：2、4、および17のアミノ酸配列において、1位の Met から 32位の Ala までと推定された。したがって、本発明は配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、33位の Ala から 652位の Asp までからなる蛋白質を包含する。同様に、配列番号：4に記載のアミノ酸配列において、33位の Ala から 252位の Val

までからなる蛋白質を包含する。同様に、配列番号：17に記載のアミノ酸配列において、33位のAlaから662位のIleまでからなる蛋白質を包含する。

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質であれば、本発明のタンパク質をコードするDNA(例えば配列番号：1、3、または16に記載の塩基配列を有するDNA)を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

また、本発明のタンパク質をグルタチオンSトランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞(例えば、動物細胞や大腸菌など)内で発現させた場合には、発現させた組み換えタンパク質はグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。

融合タンパク質の精製後、必要に応じて融合タンパク質のうち目的のタンパク質以外の領域を、トロンピンまたはファクターXaなどにより切断し、除去することも可能である。

天然のタンパク質であれば、当業者に周知の方法、例えば、本発明のタンパク質を発現している組織や細胞の抽出物に対し、後述するNR10タンパク質に結合する抗体が結合したアフィニティークラムを作用させて精製することにより単離することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明のタンパク質に特異的なアミノ酸配列からなる部分ペプチドは、少なくとも7アミノ

酸、好ましくは 8 アミノ酸以上、さらに好ましくは 9 アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明のタンパク質に対する抗体の作製、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニングや、本発明のタンパク質の促進剤や阻害剤のスクリーニングに利用し得る。また、本発明のタンパク質のリガンドに対するアンタゴニストになり得る。本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、配列番号：2、4、または 17 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の活性中心からなる部分ペプチドが挙げられる。また、疎水性プロット解析から推定される疎水性領域や親水性領域の 1 つあるいは複数の領域を含む部分ペプチドが挙げられる。これらの部分ペプチドは 1 つの疎水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよいし、1 つの親水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよい。また、例えば、本発明のタンパク質の可溶性蛋白質や細胞外領域からなるタンパク質も本発明に包含される。

本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードする DNA を提供する。本発明の DNA は、上述したような本発明のタンパク質の *in vivo* や *in vitro* における生産に利用される他、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患の遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明の DNA は、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、いかなる形態でもよい。即ち、mRNA から合成された cDNA であるか、ゲノム DNA であるか、化学合成 DNA であるかなどを問わない。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。

本発明の DNA は、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞より cDNA ライブラリーを作製し、本発明

の DNA の配列（例えば、配列番号：1 または 3）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNA ライブラリーは、例えば Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載の方法により調製してもよいし、市販の DNA ライブラリーを用いてもよい。また、本発明のタンパク質を発現している細胞より RNA を調製し、本発明の DNA の配列（例えば、配列番号：1、3、または 16）に基づいてオリゴ DNA を合成し、これをプライマーとして用いて PCR 反応を行い、本発明のタンパク質をコードする cDNA を増幅させることにより調製することも可能である。

また、得られた cDNA の塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られた cDNA をプローブとしてゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノム DNA を単離することができる。

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明のタンパク質を発現する細胞、組織、臓器（例えば卵巣、精巣、胎盤など）から、mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit(Pharmacia)等を使用して全 RNA から mRNA を精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia)を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプライマー等を用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit(Clontech 製)およびポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction ; PCR)を用いた 5'-RACE 法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucl

eic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)にしたがい、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認することができる。

また、本発明のDNAにおいては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる(Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, 43-74)。また、本発明のDNAは、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン(ATG)及び/又は終止コドン(TAA、TGA、又はTAG)の挿入等が挙げられる。

本発明のDNAは、具体的には、配列番号：1の塩基配列において523位の塩基Aから2478位の塩基CからなるDNA、配列番号：3の塩基配列において523位の塩基Aから1278位の塩基GからなるDNA、および配列番号：16の塩基配列において11位の塩基Aから1996位の塩基AからなるDNAを包含する。

本発明のDNAはまた、配列番号：1、3、または16に示す塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ上記本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを含む。

ストリンジентな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジентな条件が挙げられる。低ストリンジентの条件とは、例えば42°C、2×SSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50°C、2×SSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジентな条件が挙げられる。高ストリンジентな条件とは、例えば65°C、2×SSC及び0.1%SDSが挙げられ

る。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA を得ることができる。上記のハイブリダイズする DNA は好ましくは天然由来の DNA、例えば cDNA 又は染色体 DNA であってよい。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明の DNA を保持したり、本発明のタンパク質を発現させるために有用である。

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script などが挙げられる。また、cDNA のサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7 などが挙げられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主を JM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blue などの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZ プロモーター (Ward ら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araB プロモーター (Better ら, Science (1988) 240, 1041-1043)、または T7 プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他に pGEX-5X-1 (Pharmacia 社製)、「QIAexpress system」(Qiagen 社製)、pEGFP、または pET(この場合、宿主は T7 RNA ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい)などが挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていて

もよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外にも、例えば、本発明のタンパク質を製造するために、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (Invitrogen 社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL 社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えば pMH1、pMH2)、動物ウィルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウィルス由来の発現ベクター (例えば、pZIpneo)、酵母由来の発現ベクター (例えば、「Pichia Expression Kit」(Invitrogen 社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50) が挙げられる。

CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えば SV40 プロモーター (Mulligan ら, Nature (1979) 277, 108)、MLV-LTR プロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushima ら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMV プロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418 など) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 などが挙げられる。

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損した CHO 細胞にそれを相補する DHFR 遺伝子を有するベクター (例えば、pCHO1 など) を導入し、メトトレキサート (MTX) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T 抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つ COS 細胞を用いて

SV40の複製機転を持つベクター (pcD など) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

一方、動物の生体内で本発明の DNA を発現させる方法としては、本発明の DNA を適当なベクターに組み込み、レトロウィルス法、リボソーム法、カチオニックリボソーム法、アデノウィルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、本発明の NR10 遺伝子の変異に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウィルスベクター (例えば pAdexlcw) やレトロウィルスベクター (例えば pZIPneo) などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明の DNA の挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning, 5.61-5.63)。生体内への投与は、ex vivo 法であっても、in vivo 法であってもよい。

また、本発明は、本発明の DNA を発現可能の保持する形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の形質転換体は、例えば、本発明のタンパク質の製造や発現のための産生系として使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、in vitro および in vivo の産生系がある。in vitro の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med.

(1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., *Nature* (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に、DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特に CHO 細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオンリボソーム DOTAP (ペーリンガー・マンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とする DNA により形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDM を使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は、約 6~8 であるのが好ましい。培養は、通常、約 30~40°C で約 15~200 時間行い、必要に応じ

て培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* でタンパク質を産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とする DNA を導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glas er, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とする DNA を、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的のタンパク質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のタンパク質をコードする DNA を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のタンパク質を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするタンパク質をコードする DNA を植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本

タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

これにより得られた本発明のタンパク質は、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。

なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

また、本発明は、本発明のタンパク質と結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、完全なタンパク質であってもよいし、また、タンパク質の部分ペプチドであってもよい。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、タンパク質のアミノ基 (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とはタンパク質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。

本発明のタンパク質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的のタンパク質又はその断片を公知の方法で得て、これらを感作抗原として用いればよい。また、タンパク質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のタンパク質を感作抗原として使用してもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル (旧世界ザル)、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的な方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジ

- 25 -

ュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4~21 日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

ここで、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテイン A あるいはプロテイン G カラムを利用して精製することにより、免疫グロブリン G あるいは M を調製することができる。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリド

ーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日・数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えば EB ウィルスに感染したヒトリンパ球を *in vitro* でタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭 63-17688 号公報）。

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明のタンパク質が関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてタンパク質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号 W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735 および W096-34096 参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子 (oncogene) により不死化させた細胞を用いてもよい。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産

生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebæck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードする DNA をハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv 又は H 鎖と L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パバイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照）。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も含まれる。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来の CDR（相補性決

定領域)とヒト抗体由来の FR (フレームワーク領域) 及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 等により行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F.(Pharmacia)等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISA を用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のタンパク質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培

養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。タンパク質としてタンパク質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia 製)を使用することができる。

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明のタンパク質の検出又は測定方法を実施することができる。

本発明のタンパク質の検出又は測定方法は、タンパク質を特異的に検出又は測定することができるため、タンパク質を用いた種々の実験等に有用である。

本発明はまた、ヒト NR10 タンパク質をコードする DNA (配列番号：1、3、または16) またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

ここで「相補鎖」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

このようなポリヌクレオチドには、本発明のタンパク質をコードするDNAの検出や増幅に用いるプローブやプライマー、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等)が含まれる。また、このようなポリヌクレオチドは、D

NAチップの作製に利用することもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：1、3、または16の塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1、3、または16の塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補配列であるもののみならず、DNAまたはmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1、3、または16に示される塩基配列に特異的にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のタンパク質の産生細胞に作用して、該タンパク質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明のタンパク質の発現を抑制することにより、結果的に本発明のタンパク質の作用を抑制する効果を有する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注

射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リボソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1~100mg/kg、好ましくは0.1~50mg/kgの範囲で投与することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明のタンパク質の発現を阻害し、従って本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

本発明の蛋白質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する化合物を含むと予想される被験試料とを接触せしめ、そして本発明の蛋白質と該化合物との結合活性を検出し、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する、ことからなる本発明の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

スクリーニングに用いられる本発明のタンパク質は組換えタンパク質であっても、天然由来のタンパク質であってもよい。また部分ペプチドであってもよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質として、

可溶型タンパク質として、担体に結合させた形態として、他のタンパク質との融合タンパク質として、細胞膜上に発現させた形態として、また、膜画分として被検試料に接触させることができる。

本発明のタンパク質を用いて、例えば該タンパク質に結合するタンパク質（リガンド等）をスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明のタンパク質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA I, pCD8などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしてはSV40 early promoter(Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1 α promoter(Kim ら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter(Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter(Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR α promoter(Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter(Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter(Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法(Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法(Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAE デキストラン法(Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リボフェクチン法(Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science

259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）を本発明のタンパク質のN末またはC末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合タンパク質として本発明のタンパク質を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。マルチクローニングサイトを介して、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP) などとの融合タンパク質を発現することができるベクターが市販されている。

融合タンパク質にすることにより本発明のタンパク質の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合タンパク質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン (His-tag)、インフルエンザ凝集素 HA、ヒト c-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖タンパク質 (VSV-GP)、T7 gene10 タンパク質 (T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 (HSV-tag)、E-tag (モノクローナルファージ上のエピトープ) などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明のタンパク質、それと結合能を有するタンパク質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明のタンパク質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明のタンパク質に対する抗体は、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたタンパク質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。

また、合成した本発明のタンパク質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができる。また、本発明のタンパク質を、例えば、GST などのエピトープとの融合タンパク質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4B などのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明のタンパク質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献 (Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)) 記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

免疫沈降されたタンパク質の解析には SDS-PAGE が一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることでタンパク質の分子量により結合していたタンパク質を解析することができる。また、この際、一般的には本発明のタンパク質に結合したタンパク質は、クマシー染色や銀染色といったタンパク質の通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である ^{35}S -メチオニンや ^{35}S -システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のタンパク質を標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。タンパク質の分子量が判明すれば直接 SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的のタンパク質を精製し、その配列を決定することもできる。

また、本発明のタンパク質を用いた、これに結合するタンパク質の単離は、例えば、ウェストウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。すなわち、本発明のタンパク質と結合する結合タンパク質を発現していることが予想される細胞、組織、臓器(例えば心臓、胎盤、精巣、胸腺、抹消血白血球などの組織・細胞や培養細胞など) よりファージベクター (λ gt11, ZAP など) を用いた cDNA ライブラリーを作製し、こ

れを LB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、精製して標識した本発明のタンパク質と上記フィルターとを反応させ、本発明のタンパク質と結合したタンパク質を発現するブランクを標識により検出すればよい。本発明のタンパク質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質に融合したペプチド又はポリペプチド（例えば GST など）に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた 2-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292, Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612, 「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」 (いずれも Clontech 社製)、 「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」 (Stratagene 社製)) を用いて行う方法が挙げられる。2-ハイブリッドシステムにおいては、本発明のタンパク質を SRF DNA 結合領域または GAL4 DNA 結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16 または GAL4 転写活性化領域と融合する形で発現するような cDNA ライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来 cDNA を単離する (酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる)。単離した cDNA を大腸菌に導入して発現させることにより、該 cDNA がコードするタンパク質を得ることができる。これにより本発明のタンパク質に結合するタンパク質またはその遺伝子を調製することが可能である。2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3 遺伝子の他、Ade2 遺伝子、LacZ 遺伝子、CAT 遺伝子、

ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明のタンパク質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明のタンパク質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明のタンパク質に結合したタンパク質を調製することができる。

得られたタンパク質は、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴ DNA を合成し、該 DNA をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク質をコードする DNA を得ることができる。

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは本発明のタンパク質と被検化合物との間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えば BIAcore、Pharmacia 製）。したがって、BIAcore 等のバイオセンサーを用いることにより本発明のタンパク質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

また、タンパク質に限らず、本発明のタンパク質に結合する化合物（アゴニスト、およびアンタゴニストを含む）を単離する方法としては、例えば、固定した本発明のタンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法（Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe

LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdin e GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9) が当業者に公知である。

また、本発明蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングは、本発明蛋白質の細胞外ドメインと既知のシグナル伝達能を有するヘモポエチン受容体蛋白質の細胞膜貫通ドメインを含む細胞内ドメインとを連結せしめて作製したキメラ受容体を、適当な細胞株、好ましくは適当な増殖因子の存在下でのみ生存および増殖可能な細胞株（増殖因子依存性細胞株）の細胞表面に発現せしめた後、該細胞株を種々の増殖因子、サイトカイン、または造血因子等を含むことが期待される材料を添加して培養することにより実施可能である。この方法は、被検材料中に本発明蛋白質の細胞外ドメインと特異的に結合するリガンドが存在する場合にのみ、上記増殖因子依存性細胞株が生存および増殖が可能であることを利用している。既知のヘモポエチン受容体としては、例えば、トロンボポエチン受容体、エリスロポエチン受容体、G-CSF 受容体、gp130 等が挙げられるが、本発明のスクリーニング系に用いるキメラ受容体のパートナーは、これら既知のヘモポエチン受容体に限定されるものではなく、細胞質ドメインにシグナル伝達活性に必要な構造を備えているものであれば何を用いても構わない。増殖因子依存性細胞株としては、例えば、BaF3 や FDC-P1 を初めとした IL3 依存性細胞株を利用することが可能である。

本発明の蛋白質と特異的に結合するリガンドとしては、希ではあるが可溶性蛋白質ではなく細胞膜結合型蛋白質である可能性も想定される。この様な場合にはむしろ本発明の蛋白質の細胞外ドメインのみを含む蛋白質あるいは当該細胞外ドメインに他の可溶性蛋白質の部分配列を付加した融合蛋白質を標識後、リガンドを発現していることが期待される細胞との結合を測定することによりスクリーニ

ングすることが可能である。本発明の蛋白質の細胞外ドメインのみを含む蛋白質としては、例えば、細胞膜貫通ドメインのN端側に終止コドン挿入することにより人為的に作成した可溶性受容体蛋白質、あるいはNR10-2等の可溶性蛋白質が利用可能である。一方、本発明のタンパク質の細胞外ドメインに他の可溶性蛋白質の部分配列を付加した融合蛋白質としては、例えば、免疫グロブリンのFc部位やFLAGペプチド等を細胞外ドメインのC端に付加して調製した蛋白質が利用可能である。これらの可溶性標識蛋白質は上述したウエストウエスタン法における検出にも利用可能である。

例えば、本発明の蛋白質の細胞外領域と抗体（例えばヒトIgG抗体）のFc領域とのキメラ蛋白質は、プロテインAカラム等を用いて精製することができる。このような抗体様キメラ蛋白質は、リガンドの結合活性を有することから、適宜、放射性同位元素等で標識した後、リガンドのスクリーニングに用いることができる（Suda, T. et al., Cell, 175, 1169-1178 (1993)）。また、TNFファミリー分子などのある種のサイトカインでは、その多くが膜結合型でも存在することから、各種の細胞と抗体様キメラ蛋白質を反応させて、結合活性を示した細胞から、リガンドを単離する事ができる可能性もある。また、cDNAライブラリーを導入した細胞を用いて同様にリガンドを単離することができる。さらに、抗体様キメラ蛋白質をアンタゴニストとして用いることも可能である。

スクリーニングにより単離され得る化合物は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害するための薬剤の候補となり、本発明のタンパク質の発現異常や機能異常などに起因する疾患の治療への応用が考えられる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明のタンパク質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物に含まれる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物や本発明のタンパク質（デコイ型（可溶性型））をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、

ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50 と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジ

ル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

例えば、本発明のタンパク質（デコイ型（可溶性型））の投与量は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 100 μ g から 10 \sim 20mg であると考えられる。

例えば、本発明のタンパク質と結合する化合物や本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 0.1 から 100mg、好ましくは約 1.0 から 50mg、より好ましくは約 1.0 から 20mg である。

非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 0.01 から 30mg、好ましくは約 0.1 から 20mg、より好ましくは約 0.1 から 10mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、gss データベース内に同定した AQ022781 の塩基配列を記載した。予測可能であったエキソン配列の下にアミノ酸配列も併記した。標的とした YR モチーフ配列、及び WS モチーフ配列のアミノ酸をそれぞれ枠で囲って示した。また、塩基配列中、2 箇所の n についても枠で囲った。

図 2 は、AQ022781 配列内に見出した NR10 の部分アミノ酸配列と相同性を示す、既知ヘモエチン受容体の部分アミノ酸配列をそれぞれ併記した。一致するアミノ酸配列に枠付きの影を施し、また、類似性質を示すアミノ酸配列に影を施した。さらにギャップスペースはバーで補足した。上段から順に、ヒト gp130 (Gen Bank Accession#NM002184.1 IL6ST)、ヒト LIF 受容体 (GenBank Accession #NM002310.1 LIFR)、ヒト Oncostatin M 受容体ベータサブユニット (Gen Bank Accession#NM003999.1 OSMR)、ヒト IL-12 受容体ベータ 2 サブユニット (GenBank Accession#NM001559.1 IL12RB2)、及びヒト NR6 (GenBank Accession#AC003112) を記載した。

図 3 は、5'-RACE、及び 3'-RACE によって得られた産物を複合した、NR10.1 の完全長 cDNA の塩基配列を示した。NR10.1 がコードするアミノ酸配列も併記した。また、分泌シグナル配列と予測されるアミノ酸配列に下線を施した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に影を施した。保存されたシステイン残基、及び WS モチーフのアミノ配列を枠付きで示した。

図 4 は、図 3 の続きである。

図 5 は、図 4 の続きである。

図 6 は、5'-RACE、及び 3'-RACE によって得られた産物を複合した、NR10.2 の完全長 cDNA の塩基配列を示した。NR10.2 がコードするアミノ酸配列も併記した。また、分泌シグナル配列と予測されるアミノ酸配列に下線を施した。さらに、保存されたシステイン残基、及び WS モチーフのアミノ配列を枠付きで示した。

図 7 は、図 6 の続きである。

図 8 は、RT-PCR 法により各ヒト臓器における NR10.1 の遺伝子発現分布を解析

した結果を示す写真である。

図 9 は、RT-PCR 法により各ヒト臓器における NR10.2 の遺伝子発現分布を解析した結果を示す写真である。

図 10 は、サザンブロッティングにより各ヒト臓器における NR10.1 の遺伝子発現分布を定量解析した結果を示す写真である。

図 11 は、サザンブロッティングにより各ヒト臓器における NR10.2 の遺伝子発現分布を定量解析した結果を示す写真である。

図 12 は、発現ベクターにおいて構築した発現可能なタンパク質の構造模式図を示す。

図 13 は、NR10.3 完全長 cDNA の塩基配列を示した。NR10.3 がコードするアミノ酸配列も併記した。また、分泌シグナル配列と予測されるアミノ酸配列に下線を施した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に色塗りを施した。保存されたシステイン残基、及び WS モチーフのアミノ酸配列を枠付きで示した。

図 14 は、図 13 の続きである。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] NR10.1 遺伝子および NR10.2 遺伝子の単離

(1) Blast 検索

ヘモポエチン受容体ファミリーに保存されている Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser モチーフ (WS モチーフ) 以外にファミリー内で保存されているモチーフが見出されれば、これら双方のモチーフ配列を包括的に含有するオリゴヌクレオチドプローブ配列を設計することが考えられる。そこで、ヘモポエチン受容体ファミリーに保存されている Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser モチーフ (WS モチーフ) 以外の部位において、ファミリー内で保存されているモチーフを検討した。その結果、同ファミリーの細

胞外領域においてWSモチーフより13~27アミノ酸上流に位置するチロシン残基、あるいはヒスチジン残基が高い確立で保存されていることを見出した。さらに、その Tyr/His 残基から C 末端方向の 6 アミノ酸において、高頻度に出現するコンセンサス配列を検討した結果、(Tyr/His)-Xaa-(Hydrophobic/Ala)-(Gln/Arg)-Hydrophobic-Arg といったアミノ酸配列（以下 YR モチーフと称する）を見出した。しかしながら、この YR モチーフは必ずしも完全なコンセンサス配列と断定できるものではなく、また、このモチーフをコードする塩基配列の組合わせは複雑性に富んでいる。従って、現実的なスクリーニングの手段となるハイブリダイゼーションのためのプローブや、あるいは RT-PCR を目的とするプライマーとして、このアミノ酸配列の全てをコード可能なオリゴヌクレオチドを合成、且つスクリーニング実験に供することは困難であると考えられた。

そこで、上記 2 種類のモチーフをプローブとして利用する具体的な新規ヘモポエチン受容体ファミリーメンバーの検索手段を検討した結果、双方のモチーフ配列を共に含むように、既知ヘモポエチン受容体を断片化した部分アミノ酸配列を質問式として用いる、コンピュータ上でのデータベース検索が妥当であると判断した。

はじめに、両モチーフの必要条件を満たすアミノ酸配列を模造し、データベース検索に応用可能な質問式配列を調製した。同受容体群においては、この両モチーフ間に通常 7 個~10 数個程度の任意のアミノ酸スペースを挟んでいる。そこで、先ずこのスペース数の平均値をとり 10 アミノ酸に固定した。ここで、標的遺伝子と質問式配列の間で、このスペース配列の長さが異なる場合でも、さらにギャップスペースによって補足されることで、検索上の支障とはならないと判断した。また、可能な限り質問式配列の未決定アミノ酸数を減少させ、配列の質を高めることで、検索感度の向上を試みた。そこで、既知ヘモポエチン受容体において出現率の高かった配列に基づき、表 1 のように YR モチーフ配列、スペース両端に位置するそれぞれ 2 個のアミノ酸、及び WS モチーフ中央と C 末端のアミノ酸につい

て、各々暫定的に 3 パターンを模造した。

表 1

YR モチーフ	スペーサーアミノ酸	WS モチーフ
YTVQVR	AR XXXXXX GT	WSEWSP
YEARVR	VQ XXXXXX GY	WSDWSE
YSLQLR	CK XXXXXX GI	WSPWSQ

表 1 に記した YR モチーフ、スペース、及び WS モチーフの組合わせにより、27 通りの質問式配列を作成することが可能である。ここで作成した質問式配列を利用し、GenBank の nr データベースに対して TblastN(Advanced TblastN 2.0.8) プログラムを用いた検索を試みた。検索のパラメータは Expect 値=100、Descriptions 値=100、Alignments 値=100 を用いた。その結果、多数の既知ヘモポエチン受容体が陽性を示したことで、以上の検索方法が正しく作用することを確認した。そこで次に新規ヘモポエチン受容体をコード可能な配列を検出する目的で、同様の質問式配列を利用し EST データベース、及び gss、htgs データベースに対する検索をおこなった。しかしながら、結果は新規性を示す陽性クローンは 1 つも得られなかった。ここで上記 27 通りの質問式では、その配列の多様性に制限があることが、最大の原因であると考えられた。従って、質問式配列作成のさらなる多様化も検討したが、その配列の組合わせが、あまりにも複雑性に富んでいたため、マニュアルによるこれ以上の配列模造は断念した。これらの理由により、上記検索に用いる質問式配列を便宜的に作成する手段として、YR モチーフと WS モチーフ双方の配列を共に含むように既知ヘモポエチン受容体を断片化した部分アミノ酸配列の作成を検討した。

ここで同受容体群のゲノム構造をファミリー間で比較すると、検討した全ての既知ヘモポエチン受容体において、上記 YR モチーフと WS モチーフは同一のエキ

ソン部分にコードされていた。このことは即ち、両モチーフ配列の連続的並存性が、ゲノム配列上においても成立する可能性の高いことを意味する。従って、EST データベースのみならず、ゲノムデータベースに対する標的遺伝子の検索手段として、既知ヘモポエチン受容体における、この両モチーフ配列をコードするエキソン部分を質問式として用いることで有効に作用することが期待された。また、本実験では既知ヘモポエチン受容体配列としてヒト gp130、及びヒト LIF 受容体を用いた。その理由は同受容体ファミリー群の中でも、比較的これら受容体は構造的に相同性を有しており、この両者に保存された相同性が、新規標的受容体遺伝子でも保存されていることを期待したものである。なお、ヒト gp130、及びヒト LIF 受容体配列は既に公知の配列であるが、本発明者らは敢えて、以前より行なっていた WS モチーフをプローブに用いたブラークハイブリダイゼーション、及び RT-PCR によって、独自に単離した cDNA クローンがコードするアミノ酸配列を利用した。

ここで既知ヘモポエチン受容体のゲノム構造上、これら YR モチーフ、及び WS モチーフをコードするエキソンが、およそ 50 から 70 アミノ酸程度であることから、ヒト gp130、及びヒト LIF 受容体のそれぞれについて、便宜的に YR モチーフの 1 番目のコドンである Tyr 残基を基準として、N 末端側に 29 アミノ酸、C 末端側に 30 アミノ酸の合計 60 アミノ酸を切り取り質問式配列とした。尚、WS モチーフを 2 箇所繰り返して保有している LIF 受容体については、YR モチーフの保存性を考慮し、2 箇所目 (C 末端側) の配列を用いた。以上の配列を質問式とし、TblastN (Advanced TblastN 2.0.8) プログラムを用いた検索を、GenBank の gss (Genomic Survey Sequence)、及び htgs データベースに対しておこなった。検索のパラメータは「Expect 値=50、Descriptions 値=100、Alignments 値=100」を用いた。

選択した 60 アミノ酸は、厳密には実際のエキソン配列の長さとは若干異なる。しかしながら、このエクソンの長さは既知ヘモポエチン受容体遺伝子毎においても若干異なることと、上記の YR モチーフ、及び WS モチーフの保存度を指標とし

て重視することによって、検索を行う上での支障とはならないと判断した。また、検索対象として GenBank の gss、及び htgs データベースを選択した理由は、これらのゲノム配列はその複雑性から完全に解析がなされていないのが現状であるため、未知の受容体遺伝子の発掘を目的とする材料として、適宜であると判断したことによる。本実験での検索パラメータで「Expect 値=50、Descriptions 値=100、Alignments 値=100」とした理由は、前記 27 通りの模造配列を質問式とした場合よりも質問式配列が長鎖であるため、検索感度を下げて疑陽性クローンの増加誘因を回避したことによる。このことが、標的としたモチーフ配列以外の部分での、相同性を示すような疑陽性クローンの検出抑制に作用し、標的遺伝子の検出を可能にすると考えられる。

検索の結果、多数の疑陽性クローンがヒットしたが、ここで上記 YR モチーフと WS モチーフが同一の読み枠にコードされていないもの、あるいは双方のモチーフ配列間に終止コドンのあるものは排除した。また、YR モチーフを保有していても、WS モチーフを保存していないクローンも検索対象から除外した。それは、前述のように YR モチーフは完全に確立できたコンセンサス配列ではないため、WS モチーフの保存度の優位性を重要視したものである。以上の選別により唯一、1 クローンの新規ヘモポエチン受容体遺伝子の一部をコードし得ると推測されるヒトゲノム配列(Gen Bank Accession#A0022781)を同定し、この遺伝子を NR10 と命名した。

A0022781 は gss データベースに登録されている 459 bp の BAC クローン末端配列であり、ヒト gp130、LIF 受容体、何れの部分アミノ酸配列を質問式とした場合においても陽性を示した唯一のクローンであった。その得られた塩基配列は途中 2 箇所 に n を含むことと、Genomic Survey Sequence そのものの登録特質上、信頼度の高い配列ではない危険性は十分に推測された。しかしながら、図 1 に示すように 175 番目～218 番目の c/t 高含有配列に続く ag 配列より、スプライスコンセンサスが認められ、その後続く atg からの配列がエキソン部位であることが

予測可能であった。次に、この予測したエキソン配列を質問式として、GenBankのnrデータベースに対するBlastX(Advanced BlastX 2.0.8)検索をおこなった結果、図2に示すように複数の既知ヘモポエチン受容体遺伝子との相同性を検出した。AQ022781はYRモチーフとして[YVIALR]配列を有し、WSモチーフとして[WSDWS]配列を完全に保存していたことや、複数の既知同受容体との相同性を示したこと、さらにWSモチーフ内のSer残基をコードする塩基コドンが、2箇所ともAG(C/T)であったことなどから、新規ヘモポエチン受容体遺伝子をコードし得ると予測した。既知同受容体群のWSモチーフ内におけるSer残基の塩基コドンは、EPO受容体、TP0受容体、マウスIL-6受容体においてのみ、2番目のSer残基がTCNのコドンによってコードされているが、それ以外の殆どの場合AG(C/T)である。実際、偶然にWSモチーフ様配列を有していた疑陽性クローンの場合、TCNコドンのSer残基であることが多く、AG(C/T)コドンのSer残基は陽性クローン選別における1つの指標ともなった。そこで、AQ022781内の予測したエキソン配列上に、特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、これらプライマーを後述の5'-RASE法、及び3'-RACE法に提供した。

(2) オリゴヌクレオチドプライマーの設計

(1)に示したように、AQ022781配列内にエキソン部位を予測し、その予測した配列をもとに、下記配列に示すNR10特異的なオリゴヌクレオチドプライマーをデザインした。プライマーは、センス側(下流方向)にNR10-S1、NR10-S2、及びNR10-S3の3本を、またアンチセンス側(上流方向)にNR10-A1、NR10-A2、及びNR10-A3の3本をそれぞれ合成した。プライマーの合成には、ABI社の394 DNA/RNA Synthesizerを使用し、5'-末端トリチル基付加条件にて実施した。その後、0 PC column(ABI#400771)にて、完全長の合成産物を精製した。

NR10-S1; 5'-ATG GAA GTC AAC TTC GCT AAG AAC CGT AAG-3' (配列番号: 5)

NR10-S2; 5'-CCA AAC GTA CAA CCT CAC GGG GCT GCA ACC-3' (配列番号: 6)

NR10-S3; 5'-GTC ATA GCT CTG CGA TGT GCG GTC AAG GAG-3' (配列番号: 7)

NR10-A1; 5'-agt agc ttg cgt TCT TCC TCA GCT ATT CCC-3' (配列番号: 8)

NR10-A2; 5'-CTT TGA CTC CTT GAC CGC ACA TCG CAG AGC-3' (配列番号: 9)

NR10-A3; 5'-GGT TGC AGC CCC GTG AGG TTG TAC GTT TGG-3' (配列番号: 10)

これらプライマー配列を設計するにあたって、図1に示したAQ022781配列の376番目の塩基nについては仮にcと想定し、その部位に対応するNR10-A1プライマー配列の11番目の塩基をgに置換した。また、AQ022781配列内におけるスプライシングコンセンサス配列の検討より予測可能であった、最小エキソン部位は211番目の塩基aから399番目の塩基cまでであり、次のgt配列からイントロンであると推測された。ところが、後述の3'-RACE産物の解析結果より、376番目の塩基n、或いは377番目の塩基gからイントロンに突入することが判明した。従って、結果的に上記NR10-A1プライマー配列中、小文字で記した部分のmRNA転写は起こらないため、この11塩基はPCR反応の際に正しく結合できない。しかし、残る19塩基の3'-末端配列が特異的に結合可能であったため、PCR反応が正しく作用したものと考えられる。

(3) 3'-RACE法によるC末端cDNAのクローニング

NR10の全長cDNAを単離するために、(2)に記載のNR10-S1プライマーを一次PCRに用い、また、NR10-S2プライマーを二次PCRに用いて3'-RACE PCRを試みた。鋳型としてHuman Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Library(Clontech#7403-1)を用い、PCR実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mix(Clontech#8417-1)を使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用し、下記のPCR条件で実施した結果、選択的スプライシングによる2種類のサイズを示すPCR産物が得られた。

一次PCRの条件は、94°Cで4分、「94°Cで20秒、72°Cで100秒」を5サイクル、「94°Cで20秒、70°Cで100秒」を5サイクル、「94°Cで20秒、68°Cで100秒」を28サイクル、72°Cで3分、および4°Cにて終結である。

二次PCRの条件は、94°Cで4分、「94°Cで20秒、70°Cで100秒」を5サイクル、

「94°Cで20秒、68°Cで100秒」を25サイクル、72°Cで3分、および4°Cにて終結である。

得られた2種類のPCR産物は双方とも、pGEM-T Easy vector(Promega #A1360)にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA Ligase(Promega#A1360)によって、4°C/12時間の反応をおこなった。PCR産物とpGEM-T Easy vectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株DH5 α (Toyobo#DNA-903)を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready Blue(Toyobo#PIK-201)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、BigDye Terminator Cycle Sequencing SF Ready Reaction Kit(ABI/Perkin Elmer#4303150)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析をおこなった。独立する6クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した結果、塩基対の長さ、及び配列の相違により、それぞれ3クローンずつの二種類のグループに区別することができた。これは、選択的スプライシングに起因する産物の相違であり、この得られた配列が、双方共にNR10の部分塩基配列である事を認めた。ここで、膜貫通領域を含む長いORFをコードし得るcDNAクローンをNR10.1と命名し、膜貫通領域を保有しない短いORFをコードするcDNAクローンをNR10.2と命名することで区別した。

(4) 5'-RACE法によるN末端cDNAのクローニング

NR10の全長cDNAを単離するために、実施例2のNR10-A1プライマーを一次PCRに用い、また、NR10-A2プライマーを二次PCRに用いて5'-RACE PCRを試みた。3'-RACE法同様に鋳型としてHuman Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Libraryを用い、PCR実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mixを使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用し、(3)と同様のPCR条件で実施した結果、3種類のサイズの異なるPCR産物が得られた。得られた3種類のPCR産物は全て、前述同様、pGEM-T Easy vectorにサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA Lig

ase によって、4°C/12 時間の反応をおこなった。PCR 産物と pGEM-T Easy vector の遺伝子組換え体は、大腸菌株 DH5 α を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別も前述と同様に、Insert Check Ready Blue を用いた。塩基配列の決定においても、BigDye Terminator Cycle Sequencing SF Ready Reaction Kit を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析を実施した。その結果、得られたサイズの異なる 3 種類の 5'-RACE 産物は全て、同一の mRNA 転写産物に由来することが判明した。ここで、3 種類の産物が異なるサイズを示した理由は、5'-RACE の伸長反応が不完全であったことに起因するためであり、スプライス変異体に由来した産物である可能性は否定された。しかし、これら 3 種類の 5'-RACE 産物のうち、最も長い伸長産物を示した cDNA クローンであっても、完全長の 5'-末端には伸長が及んでいなかった。また、(2) の NR10-A2 プライマーを一次 PCR に用い、NR10-A3 プライマーを二次 PCR に用いた 5'-RACE PCR を試みた場合でも同様の結果しか得られなかった。そこで、さらなる 5'-RACE 伸長反応をおこなうために、得られた塩基配列の N 末端近傍に、新たなオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。プライマーの合成は、実施例 2 に従い、アンチセンス側（上流方向）に下記配列の NR10-A4、及び NR10-A5 オリゴヌクレオチドプライマーを準備した。

NR10-A4; 5'-ATC AGA TGA AAC AGG CGC CAA CTC AGG-3' (配列番号: 1 1)

NR10-A5; 5'-TGG TTT CAC ACG GAA AAT CTT AGG TGG-3' (配列番号: 1 2)

上記同様に Human Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Library を鋳型として、NR10-A4 プライマーを一次 PCR に用い、NR10-A5 プライマーを二次 PCR に用いた 5'-RACE PCR を実施した。PCR 条件、サブクローニング方法、及び塩基配列の決定方法は (3) に従った。しかしながら、塩基配列を決定した結果、上記の NR10-A1 プライマー、NR10-A2 プライマー、及び NR10-A3 プライマーを用いておこなった 5'-RACE PCR と全く同じ配列で伸長反応が終結している、不完全伸長産物しか得られなかった。この原因として、NR10 mRNA がこの部分で立体高次構造をとるため

に、一次鎖 cDNA 合成を阻害している可能性や、或いはこれより上流領域の塩基配列における g/c 含有率が高いために PCR 反応を阻害している可能性が考えられた。何れにせよ、cDNA ライブラリー調製時における、ライブラリーそれ自体の品質に問題がある場合も充分考えられるため、次項に記すように鋳型を Human Placenta Marathon-Ready cDNA Library(Clontech#7411-1)に変更して用いることとした。ここでヒト Placenta 由来の材料を選択した理由は後述の、RT-PCR 法による NR10 遺伝子の臓器発現分布解析の結果を参考にしたものである。

(5) 5'-RACE 法の継続的伸長による N 末端 cDNA のクローニング

完全長 NR10 に相当する cDNA クローンの N 末端配列を単離するために、(4)の NR10-A4 プライマーを一次 PCR に用い、また、NR10-A5 プライマーを二次 PCR に用いて 5'-RACE PCR を試みた。前項の理由により、鋳型として Human Placenta Marathon-Ready cDNA Library を用いた。PCR 実験には Advantage cDNA Polymerase Mix を使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用し、下記の PCR 条件で 5'-RACE PCR 反応を実施した結果、単一なサイズの PCR 産物が得られた。

一次 PCR の条件は、94°C で 4 分、「94°C で 20 秒、72°C で 2 分」を 5 サイクル、「94°C で 20 秒、70°C で 2 分」を 5 サイクル、「94°C で 20 秒、68°C で 90 秒」を 28 サイクル、72°C で 3 分、および 4°C にて終結である。

二次 PCR の条件は、94°C で 4 分、「94°C で 20 秒、70°C で 90 秒」を 5 サイクル、「94°C で 20 秒、68°C で 90 秒」を 25 サイクル、72°C で 3 分、および 4°C で終結である。

得られた PCR 産物は実施例 3 に従い、pGEM-T Easy vector にサブクローニングし、塩基配列を決定した。独立する 4 クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列の決定をおこなった結果、完全長 NR10 cDNA クローンの N 末端配列を含んでいることを認めた。この 5' RACE-PCR の結果、決定できた塩基配列と、(3)において決定した 3' RACE-PCR 産物の塩基配列とを総合することによ

って、最終的に完全長 NR10.1、及び完全長 NR10.2 cDNA の全塩基配列を決定した。決定した NR10.1 cDNA の塩基配列（配列番号：1）、及びそれがコードするアミノ酸配列（配列番号：2）を図3～5に示す。また、決定した NR10.2 cDNA の塩基配列（配列番号：3）と、それがコードするアミノ酸配列（配列番号：4）を図6～7に示す。

NR10 cDNA 全塩基配列を決定した結果、図1で示した AQ022781 内の 281 番目の塩基 n については、正しくは t であることが明らかとなった。しかし、376 番目の塩基 n については、丁度この配列付近からイントロンに突入するため、配列の決定には至らなかった。ところが、この 376 番目の塩基 n を何れの塩基に置換しても、この位置にスプライシングコンセンサス配列 (ag/gtaag 等) を認めることができない。これは、gss データベースの情報性質上、問題とした AQ022781 配列の 376 番目の塩基 n 周辺配列 [an/gcaag] が、実際には [ag/gtaag] であると推測される。NR10.1、及び NR10.2 の全塩基配列を決定した結果、両者はこの問題となった不明瞭なスプライシングサイトから、選択的スプライシングによって、それぞれ全く独立したエキソンに接続し、以降の C 末端は異なるアミノ酸配列をコードしていた。一次構造上 NR10.1 は 652 アミノ酸からなる細胞膜貫通型ヘモポエチン受容体蛋白をコードすることが可能であり、また、NR10.2 においては 252 アミノ酸からなる可溶性分泌型受容体様蛋白をコード可能であった。それら NR10 の特徴として以下の構造が認められる。

先ず NR10.1、及び NR10.2 の共通した細胞外領域において、アミノ酸番号 1 位の Met から 32 位の Ala までが典型的な分泌シグナル配列であると予測される。ここで、1 位の Met よりマイナス 2 位の位置に、インフレームの終止コドンが存在するため、この Met 残基が翻訳開始部位であると推定される。次に 43 位の Cys から 53 位の Cys、及び 55 位の Trp 残基までが、典型的なリガンド結合部位配列であり、さらに 81 位と 94 位の Cys 残基は他のヘモポエチン受容体メンバーにもよく保存された Cys 残基の繰り返し構造を示す。続いて 137 位と 138 位に連続す

る Pro 残基と、157 位の Trp 残基までによって、Pro-rich 領域 (PP-W モチーフ) が保存されており、210 位の Tyr から 215 位の Arg 残基までが前記 YR モチーフに相当する。さらに、224 位の Trp から 228 位の Ser 残基までに典型的な WSXWS-box (WS モチーフ) が認められる。

ここで、NR10.2 においては WSXWS 配列の後、24 アミノ酸をコードし、次の終止コドンによって翻訳フレームが終結する。これによって、細胞膜貫通ドメインを保持しない、可溶性ヘモポエチン受容体様蛋白をコードしている。一方 NR10.1 においては、上記の各保存モチーフに続き、533 位の Ile から 556 位の Leu 残基までの 24 アミノ酸に典型的な細胞膜貫通ドメインを保有している。さらに、その直後の細胞内領域における、571 位、及び 573 位の Pro 残基は、他のヘモポエチン受容体メンバーにもよく保存された Box-1 コンセンサス配列 (PXP モチーフ) であり、ここがシグナル伝達に深く関与すると考えられる。以上のような構造的特徴を保有していることから、NR10 遺伝子は新規ヘモポエチン受容体蛋白をコードしているものと断定される。

[実施例 2] RT-PCR 法による NR10 遺伝子発現組織の検索と発現様態の解析

各ヒト臓器における NR10.1、及び NR10.2 遺伝子の発現分布、及び、遺伝子発現様態を解析するために、RT-PCR 法による mRNA の検出を行った。RT-PCR 解析に用いるためのプライマーとして、下記配列のオリゴヌクレオチドプライマーを新たに合成した。センス側 (下流方向) プライマーとして NR10-S0 プライマーを用い、アンチセンス側 (上流方向) プライマーとして NR10.1-A0、及び NR10.2-A0 プライマーを用いた。プライマーの合成、及び精製は実施例 2 に従った。下記プライマーのうち NR10-S0 は、NR10.1 と NR10.2 の共通配列上に設計し、また、NR10.1-A0 は NR10.1 特異的配列上に、一方 NR10.2-A0 は NR10.2 特異的配列をもとに設計している。

hNR10-S0; 5'-GCA TTC AGG ACA GTC AAC AGT ACC AGC-3' (配列番号: 13)

hNR10.1-A0; 5'-AGC TGG AAT CCT CAG GGT GGC CAC TGG-3' (配列番号: 14)

hNR10.2-A0; 5'-GCC CAT CAC CAG AGT AGA CAG GAC GGG-3' (配列番号: 15)
鋳型として、Human Multiple Tissue cDNA (MTC) Panel I(Clontech #K1420-1)、Human MTC Panel II(Clontech#K1421-1)、Human Immune System MTC Panel(Clontech#K1426-1)、及び Human Fetal MTC Panel(Clontech#K1425-1)を用いた。PCR には Advantage cDNA Polymerase Mix(Clontech#8417-1)を用い、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用した。NR10.1 の検出のために[NR10-S0 対 NR10.1-A0]を、また NR10.2 の検出のために[NR10-S0 対 NR10.2-A0]プライマーセットをそれぞれ用いた。PCR 反応は、94°Cで 4 分、「94°Cで 20 秒、72°Cで 1 分」を 5 サイクル、「94°Cで 20 秒、70°Cで 1 分」を 5 サイクル、「94°Cで 20 秒、68°Cで 1 分」を 25 サイクル、72°Cで 3 分、および 4°Cにて終結、のサイクル条件にて実施することで、標的遺伝子の増幅を試みた。

この結果 NR10.2 については図 9 に示す通り、解析をおこなった全てのヒト臓器、及び組織由来の mRNA において殆ど一定量の構成的な遺伝子発現が検出された。これに対し図 8 に示すように NR10.1 の場合、遺伝子発現が検出された臓器、及び組織は制限されており、その発現量には大きな偏差が認められた。また解析に使用した全ての鋳型に対して、ヒト G3PDH プライマーを用い上記 PCR 条件にてハウスキーピング遺伝子 G3PDH の発現を検出することで、予め鋳型 mRNA のコピー数がサンプル間で標準化 (Normalize) されていることを確認している。以下、NR10.1 の遺伝子発現が検出された臓器を列挙すると、ヒト成体では、心臓、胎盤、精巣、胸腺、末梢白血球において強い発現を示し、さらに脾臓、骨髓、前立腺、卵巣、膵臓、肺において弱い発現が検出された。また、ヒト胎児においては、骨格筋、胸腺、心臓、腎臓で強い発現が認められ、さらに肺、肝臓、脾臓で弱い発現が検出された。その一方、ヒト成体において、脳、骨格筋、腎臓、小腸、直腸では全く発現が認めらず、また、ヒト胎児脳においても、全く発現は認められなかった。

ここで、検出された RT-PCR 増幅産物のサイズは、NR10.1 の場合 480 bp、また NR10.2 においては 243 bp であり、これは決定したそれぞれの塩基配列から計算

されるサイズと一致する。従って、これらは、それぞれ特異的な PCR 増幅反応による産物であると考えられた。このことを更に次項のサザンブロッティング法によって確認することで、それらが非特異的な PCR 増幅による産物である可能性を否定した。

NR10.1 の遺伝子発現分布を総合すると、主に免疫担当細胞、及び造血細胞を含むと考えられる臓器に強く検出されたことより、NR10 が新規ヘモポエチン受容体として機能し得る可能性が、さらに強く示唆された。また生殖系細胞、或いは内分泌系細胞や心臓においても発現分布が認められたことは、NR10 が免疫系及び造血系のみならず、多岐にわたる生体内の生理機能を調節し得る可能性をも示唆している。

NR10.2 の遺伝子発現が全ての臓器で検出されたことは、解析対象とした臓器を構成する全ての細胞において、活性を有する分泌型蛋白が産生される可能性を示唆している。ただ、ある組織間や特定の細胞群において、その機能特異性を決定するための転写調節、及び選択的なスプライシング調節が行なわれることによって、NR10 の遺伝子発現が厳密な転写制御を受けている可能性が非常に高い。

【実施例 3】 サザンブロッティング法による RT-PCR 産物の特異性の確認

実施例 2 における RT-PCR によって増幅された標的遺伝子産物は、NR10.1 及び NR10.2 それぞれに特異的な cDNA 断片をプローブとして用いたサザンブロッティング法を実施することで、それが特異的な増幅であることを確認した。また、それと同時に、RT-PCR 産物を定量的に検出することで、ヒト各臓器間における遺伝子発現の比較測定的評価を試みた。前項の RT-PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、Hybond N(+) (Amersham, cat#RPN303B) 付電荷ナイロン膜にブロッティングし、ハイブリダイゼーションに供した。NR10.1 及び NR10.2 それぞれに特異的なプローブとして、実施例 3 にて得られた、それぞれの cDNA 断片を用いた。プローブの調製は、Mega Prime Kit (Amersham, cat#RPN1607) を使用し $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham, cat#AA0005) によってラジオアイソトープ標識した。ハイブリダイゼーションには

Express Hyb-ridization Solution (Clontech#8015-2)を用い、68°C/30 分のプレハイブリダイゼーションの後、熱変性させた標識プローブを加え、68°C/120 分のハイブリダイゼーションを実施した。(1) 1x SSC / 0.1% SDS, 室温で 5 分、(2) 1x SSC / 0.1% SDS, 50°Cで 30 分、(3) 0.1x SSC / 0.1% SDS, 50°Cで 30 分の条件にて洗浄をおこなった後、Imaging Plate(FUJII#BAS-III)に露光させ、Image Analyzer(FUJIX, BAS-2000 II)によって、NR10 特異的なシグナルを検出した。

NR10.1 の検出結果を図 10 に、また NR10.2 の検出結果を図 11 に示す通り、前項の RT-PCR によって増幅された PCR 産物は、全て NR10.1 及び NR10.2 それぞれに特異的な増幅産物であることが確認された。また各臓器における発現量の比較定量についても、前項の評価を支持するものであった。一方、RT-PCR 法とサザンブロットング法を組合わせた、ここでの標的遺伝子発現の検出方法は、他の発現解析方法と比較しても極めて感度の高い検出手段であるにも関わらず、成人脳や胎児脳といった神経系、及び成人消化管では NR10.1 の発現が全く検出されなかった。さらに、胎児で強い発現が認められた骨格筋と腎臓においても、成人では全く検出されていない。

【実施例 4】 ノーザンブロットング法による NR10 遺伝子発現解析

各ヒト臓器、及びヒト癌細胞株における NR10 の遺伝子発現様態の解析と、NR10 転写サイズの同定を目的として、ノーザンブロットング法による NR10 遺伝子の発現解析を試みた。また、NR10.1 及び NR10.2 以外のさらなるスプライシング変異体の存在する可能性についても検討をおこなった。プロットには Human Multiple Tissue Northern(MTN) Blot(Clontech #7760-1)、Human MTN Blot II(Clontech #7759-1)、Human MTN Blot III(Clontech#7767-1)、及び Human Cancer Cell Line MTN Blot(Clontech#7757-1)を使用した。

プローブには実施例 1 (5) にて得られた、5' -RACE 産物の cDNA 断片を用いた。プローブの調製は実施例 3 同様、Mega Prime Kit を用い[α -³²P]dCTP によってラジオアイソトープ標識した。ハイブリダイゼーションには Express Hyb-ridizati

on Solution を用い、65°C/30 分のプレハイブリダイゼーションの後、熱変性させた標識プローブを加え、65°C/16 時間のハイブリダイゼーションを実施した。(1) 1x SSC / 0.1% SDS, 室温で 5 分、(2) 1x SSC / 0.1% SDS, 48°C で 30 分、(3) 0.5x SSC / 0.1% SDS, 48°C で 30 分の条件にて洗浄をおこなった後、前項同様に Imaging Plate に対して露光させ、Image Analyzer を使用することで、NR10 特異的なシグナルを検出を試みた。

しかしながらその結果、何れのヒト臓器においてもシグナルは検出されなかった。原因として、ノーザン解析法の場合、RT-PCR レベルと比較して検出感度がかなり低いため、発現量の低い mRNA を検出することができなかったものと考えられる。

【実施例 5】 ブラークスクリーニング

上記の NR10 遺伝子の完全長 cDNA 獲得の過程は、PCR クローニングによる手法が用いられた。これら PCR クローニングをおこなった場合、その産物配列中にしばしば点変異が発生する危険を含んでいる。そこで、前述までに得られた cDNA クローンについて、その塩基配列を再確認する目的で、ラムダファージ cDNA ライブラリーに対するブラークハイブリダイゼーションをおこない、標的遺伝子の再単離を試みた。RT-PCR による NR10 遺伝子発現解析の結果、NR10 遺伝子発現が認められた、ヒト胎盤 cDNA ライブラリー(Clontech#HL1144X)を用い、ブラークスクリーニングを行った。プローブには前項同様、実施例 1 (5) にて得られた、5'-RACE 産物の cDNA 断片を用いた。プローブの調製は実施例 3 同様、Mega Prime Kit を用い[α -³²P]dCTP によってラジオアイソトープ標識した。ハイブリダイゼーションには Express Hyb-ridization Solution を用い、65°C/30 分のプレハイブリダイゼーションの後、熱変性させた標識プローブを加え、65°C/16 時間のハイブリダイゼーションを実施した。(1) 1x SSC / 0.1% SDS, 室温で 5 分、(2) 1x SSC / 0.1% SDS, 58°C で 30 分、(3) 0.5x SSC / 0.1% SDS, 58°C で 30 分の条件にて洗浄をおこなった後、X 線フィルム(Kodak, cat#165-1512)に露光し、NR10 陽性

ブランクを検出した。

その結果、陽性クローンは1つも得られなかった。これも実施例4と同様、標的遺伝子の発現コピー数が少ないため、cDNA クローンの単離に至らなかったものと考えられる。標的遺伝子の単離には、RT-PCR 解析の結果、最も遺伝子発現量の高かった臓器である、ヒト胎児骨格筋由来のラムダファージ cDNA ライブラリーに対するブランクハイブリダイゼーションが好ましいと考えられる。

[実施例6] リガンドスクリーニング

(1) NR10 キメラ受容体の構築

NR10 に特異的に結合し得るリガンド、即ち新規ヘモポエチンを検索するためのスクリーニング系を構築する。先ず最初に NR10.1 の細胞外領域 (1 位の Met から 238 位の Glu まで、あるいは 1 位の Met から 532 位の Glu まで) をコードする cDNA 配列を PCR によって増幅し、この DNA 断片を既知のヘモポエチン受容体の細胞膜貫通領域、及び細胞内領域をコードする DNA 断片とインフレイムで結合させることによって、キメラ受容体をコードする融合配列を作製する。ここで、パートナーとなる既知ヘモポエチン受容体として、前述のようにいくつかの候補が挙げられるが、その中からヒト TP0 受容体 (Human MPL-P) を選択して用いる。すなわち、ヒト TP0 受容体の細胞膜貫通領域を含む細胞内領域をコードする DNA 配列を PCR によって増幅した後、NR10.1 の細胞外領域をコードする cDNA 配列とインフレイムで結合させ、哺乳動物細胞で発現可能なプラスミドベクター (pEF-BOS) に挿入する。構築した発現ベクターは pEF-NR10/TP0-R と称する。構築される NR10/TP0-R キメラ受容体の構造の模式図を図 12 に示す。NR10/TP0-R キメラ受容体発現ベクターはブラストサイジン S 耐性遺伝子を含む発現ベクター pSV2bsr (科研製薬株式会社製) と共に増殖因子依存性細胞株 Ba/F3 に導入して強制発現させた後、8 $\mu\text{g/ml}$ の塩酸ブラストサイジン S (科研製薬株式会社製) と IL3 の共存下で培養することにより遺伝子導入細胞を選別する。得られたキメラ受容体導入細胞を IL-3 非存在下に切り替え、標的リガンドを含むことが期待される材料を添加して培

養することにより、NR10 と特異的に結合するリガンドが存在する場合にのみ生存／増殖可能であることを利用したスクリーニングが実施可能である。

(2) NR10/IgG1-Fc 可溶性融合タンパク質の調製

細胞膜結合型リガンドの探索、あるいは BIAcore (Pharmacia 社) やウエストウエスタン法による可溶性リガンドの検出に利用すべく NR10/IgG1-Fc 可溶性融合タンパク質の調製を行う。実施例 6 (1) で調製した NR10.1 の細胞外領域 (1 位の Met から 238 位の Glu まで、あるいは 1 位の Met から 532 位の Glu まで) をコードする DNA 断片をヒト免疫グロブリン IgG1 の Fc 領域をコードする DNA 断片とインフレームで結合させることによって、該可溶性融合タンパク質をコードする融合配列を作製する。構築した NR10/IgG1-Fc がコードする可溶性融合タンパク質の構造の模式図を図 1 2 に示す⁷。該融合遺伝子断片を哺乳動物細胞で発現可能なプラスミドベクター (pEF-BOS) に挿入し、構築した発現ベクターを pEF-NR10/IgG1-Fc と名付ける。この pEF-NR10/IgG1-Fc を哺乳動物細胞に強制発現させ、安定した遺伝子導入細胞を選択した後、その培養上清に分泌される当該リコンビナントタンパク質を、抗ヒト IgG1-Fc 抗体を用いた免疫沈降、あるいはアフィニティーカラム等により精製することが可能である。

(3) NR10.2 の発現系構築とリコンビナント NR10.2 タンパク質の精製

細胞膜結合型リガンドの探索、あるいは BIAcore (Pharmacia 社) やウエストウエスタン法による可溶性リガンドの検出に利用すべくリコンビナント NR10.2 タンパク質の調製を行う。NR10.2 cDNA のアミノ酸コーディング配列を用い、終止コドン点を点変異によって任意のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換した後、インフレームで FLAG ペプチドをコードする塩基配列に結合させる。その結合断片を哺乳動物細胞で発現可能なプラスミドベクターに挿入し、構築した発現ベクターを pEF-BOS/NR10.2 FLAG と名付ける。構築した発現ベクター中の挿入断片 NR10.2 FLAG の構造の模式図を図 1 2 に示す。この pEF-BOS/NR10.2 FLAG を哺乳動物細胞に強制発現させ、安定した遺伝子導入細胞を選択した後、その培養上清に分泌

される当該リコンビナントタンパク質を、抗FLAG ヘプチド抗体を用いて免疫沈降を行うことが可能であり、あるいはアフィニティーカラム等により精製することが可能である。

【実施例7】 NR10.3 遺伝子の単離

(1) オリゴヌクレオチドプライマーの設計

連続する完全長コーディング配列を含む NR10.1 遺伝子の再単離を試みた。まず最初に、NR10.1 cDNA の塩基配列内の 5'-UTR 及び 3'-UTR 部位を選択し、下記配列のセンスプライマー（下流方向）、及びアンチセンスプライマー（上流方向）を設計した。プライマーの合成は、実施例 1（2）に従った。即ち、ABI 社の 394 DNA/RNA Synthesizer を使用し、5'-末端トリチル基付加条件にて実施し、その後、OPC column(ABI#400771)にて、完全長の合成産物を精製した。

NR10-5UTR(SN);5'-CCC CTG ATA CAT GAA GCT CTC TCC CCA GCC-3' (配列番号 : 18)

NR10-3UTR(AS);5'-CCA GTC TTC GGA GAT GGT TCT CTT GGG GCC-3' (配列番号 : 19)

(2) PCR クローニング

NR10 の完全長 CDS を単離するために、実施例 7（1）の NR10-5UTR プライマーをセンスプライマーに用い、また、NR10-3UTR primer をアンチセンスプライマーとして用いた PCR クローニングを試みた。鋳型として Human Placenta Marathon-Ready cDNA Library(Clontech#7411-1)を使用し、PCR 実験には Advantage cDNA Polymerase Mix(Clontech#8417-1)を用いた。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用し、94°Cで 4 分、「94°Cで 20 秒、72°Cで 90 秒」を 5 サイクル、「94°Cで 20 秒、70°Cで 90 秒」を 5 サイクル、「94°Cで 20 秒、68°Cで 90 秒」を 28 サイクル、72°Cで 3 分、および 4°Cにて終結、のサイクル条件にて PCR を実施した。その結果、2119 bp の増幅産物が得られた。

得られた PCR 産物は実施例 1（3）に従い、pGEM-T Easy vector(Promega #A1

- 61 -

360)にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR産物の pGEM-T Easy vector への組換えは、T4 DNA Ligase(Promega#A1360)によって、4°C/12時間の反応をおこなった。PCR産物と pGEM-T Easy vector の遺伝子組換え体は、大腸菌株 DH5 alpha(Toyobo#DNA-903)を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready Blue(Toyobo#PIK-201)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、BigDye Terminator Cycle Sequencing SF Ready Reaction Kit(ABI/Perkin Elmer#4303150)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析を行なった。独立する5クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を解析した結果、膜貫通領域を含む NR10 の完全長 CDS をコードし得る cDNA クローンの塩基配列を決定した。しかしながら、決定した配列に NR10.1 は認められず、代替的に 662 アミノ酸からなる細胞膜貫通型受容体蛋白をコード可能な cDNA クローンを示した。本発明者等は、この cDNA クローンを NR10.3 と命名することで、NR10.1 cDNA クローンと区別した。

この cDNA クローンが導入された大腸菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)

(ロ) 寄託日(原寄託日)：平成11年7月23日

(ハ) 寄託番号 生命研条寄第6793号(FERM BP-6793)

NR10.1 に対して NR10.3 cDNA クローンは、終止コドン近傍に存在するアデニン基クラスターにおける、僅か1塩基の欠損が認められ、これによってフレームシフトが発生する。NR10.1 と NR10.3 は、そのフレームシフトによって終止コドン近傍のアミノ酸配列の読み枠に相違性を示す。決定した NR10.3 の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を配列番号：16および17、並びに図13および

14に示した。

(3) NR10.1とNR10.3の存在意義

前記の通り、NR10.1とNR10.3は終止コドン近傍における1塩基の相違によって生じた配列を示すものであり、従ってスプライシング変異体による転写産物の相違ではない。また、その1塩基の欠損以外においては、NR10.1とNR10.3 cDNA クローンの相違は認めれず、それらがコードする造血因子受容体蛋白は、機能的に同等であると推測される。このような点欠損、点変異といったものが何らかの疾患に関与している可能性や、或いは家系的、または人種依存的に配列の多様性を生じている可能性もあると考え得る。

〔実施例8〕 NR10の染色体上の局在

(1) オリゴヌクレオチドプライマーの設計

NR10の染色体地図作成のため、下記配列のオリゴヌクレオチドプライマー、NR10-イントロンを合成した。NR10-イントロンプライマーはgasデータベースに登録されているAQ022781の配列中、NR10 mRNAには転写されないイントロン部位を選択し、センス方向(下流方向)に設計した。プライマーの合成は、実施例1(2)に従った。即ち、ABI社の394 DNA/RNA Synthesizerを使用し、5'-末端トリチル基付加条件にて実施し、その後、OPC column(ABI#400771)にて、完全長の合成産物を精製した。

NR10-イントロン(SN); 5'-CTG TGT AAG TAC CAA TTG TTC CCA GGC-3' (配列番号: 20)

(2) NR10遺伝子のクロモソームマッピング

NR10の染色体地図作成のため、24本のクロモソームのヒト/マウス体細胞系(Dubois B.L. and Naylor S., 1993, Genomics; 16, 315-319)のそれぞれから得られるDNAを鋳型として、PCR解析を試みた。

実施例8(1)のNR10-イントロンプライマーをセンスプライマーに用い、また、実施例1(2)にて作成したNA10-A1プライマーをアンチセンスプライマー

として利用した。PCR 実験には、Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#841 7-1) を用いた。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用し、下記の PCR 条件で実施した結果、ヒトクロモソーム染色体第 5 番に NR10 遺伝子が存在する可能性を示唆する 359bp の標的増幅産物が得られた。

PCR は、94°C で 4 分、「94°C で 20 秒、70°C で 60 秒」を 5 サイクル、「94°C で 20 秒、68°C で 60 秒」を 28 サイクル、72°C で 3 分、および 4°C にて終結、の条件にて実施した。

得られた PCR 産物は、実施例 1 (3) に従い、pGEM-T Easy vector (Promega #A1360) にサブクローニングし、ABI PRISM 337 DNA Sequencer での解析によって塩基配列を決定した。独立する 8 クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を解析した結果、NR10 の部分配列を含む、標的ゲノム DNA 断片の塩基配列であることを認め、それが非特異的な増幅産物である可能性を否定した。

上記により使用したプライマーセットが特異的に正しく作用していることを確認した後、さらに、NR10 遺伝子の領域座を、GeneBridge 4 ラジエイションハイブリッドパネル 93 (Walter et al., 1994, Nature Genetics; 7, 22-28.) を用いて決定した。上記同様に、NR10-イントロン、及び NA10-A1 プライマーセットを用い、GeneBridge 4 ラジエイションハイブリッドパネル 93 を鋳型とした PCR 解析を、上記同様の反応条件にて実施した。それぞれのハイブリッドにおける増幅産物に対して正、或いは負の定量的評価を行った。その結果を 2 進符号に置換した後、アドレス [<http://www.carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>] にあるサーバ内のプログラムを用いて、フレームワーク地図を作成する遺伝子地図マーカーについての類似コードと比較し、染色体上の位置を同定した。その結果、NR 10 は、確かに染色体第 5 番の中心体付近にマップされ、さらにマーカー WI-3071 (60-61 cM) と AFM183YB8 (67 cM) の間に存在することが確認された。

染色体第 5 番領域には、本発明者等が当初データベース検索によって NR10 を同

定するために利用した、質問式配列であるヒト gp130、及びヒト LIF 受容体遺伝子もマップされている。即ち、ヒト gp130 遺伝子は染色体第 5 番 q11(67.2-69.6 cM)にマップされており、ヒト LIF 受容体遺伝子は染色体第 5 番 p12-p13(59.9-61.1 cM)にマップされている。

一方 NR10 がこれら双方の間である、染色体第 5 番 61-67 cM にマップされたことは、進化遺伝子学的にも大変意義深い。即ち、同受容体ファミリー遺伝子群の中において構造的に比較的高い相同性を示すこれら、ヒト gp130、ヒト LIF 受容体、及びヒト NR10 遺伝子がヒト染色体第 5 番の、しかも極く限られた領域に近接して位置している事実は、これら 3 種の異なる受容体遺伝子が、本来は同一の祖先遺伝子に由来し、長い生物進化の過程において、その構造的のみならず、機能性においても多樣的遺伝子進化を成し遂げたとの仮説をも十分に示唆し得る。

産業上の利用の可能性

本発明により新規なヘモポエチン受容体蛋白質及びそれをコードする DNA が提供された。また、該 DNA が挿入されたベクター、該 DNA を保持する形質転換体、該形質転換体を利用した組換え蛋白質の製造方法が提供された。さらに、該蛋白質に結合する天然のリガンドあるいは化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明の蛋白質は、免疫や造血機能に関与すると考えられることから、免疫関連疾患や造血関連疾患の診断や治療への応用が期待される。

上に述べた通り、NR10 遺伝子は、それがコードする受容体蛋白と機能結合し得る、未知の造血因子やアゴニストを得るための有用な材料を提供するものと考えられる。このような機能結合物質、或いは NR10 分子機能を活性化し得る特異的抗体の生体投与により、生体の細胞性免疫の増強や造血機能の増強が可能であると予測される。つまり、免疫担当細胞、或いは造血細胞の増殖促進剤、または分化促進剤、或いは免疫細胞機能活性化剤としての臨床応用が可能である。また、それらを介して、ある特定種の癌組織に対する細胞傷害性免疫を高めることも可能

であるとする。さらに、NR10.1の発現はこれら造血組織中の限られた細胞集団に特異的に発現している可能性が想定され、この細胞集団を分離する手段として抗 NR10 抗体は有用である。この様にして分離された細胞集団は細胞移植療法への応用が可能である。

一方、NR10のスプライス変異体である NR10.2 はデコイ型受容体として NR10 リガンドに対する阻害剤としての利用が想定される。また、NR10 分子に機能結合し得るアンタゴニストや、その他阻害剤、或いは NR10 分子機能を阻害し得る特異的抗体の生体投与により、生体の細胞性免疫の抑制や造血細胞の増殖抑制が可能であると予測される。このような阻害物質は免疫担当細胞や造血細胞の増殖抑制剤、または分化抑制剤、或いは免疫抑制剤や抗炎症剤としての臨床応用が可能である。具体的には、自己組織傷害性に起因する自己免疫疾患発症の抑制や、移植免疫の領域において最大の問題となる、生体免疫による組織拒絶応答の抑制にも応用できる可能性もある。さらには、免疫反応の異常亢進により惹起された疾患領域に対して、極めて有効であると考えられ、金属や花粉などに対する種々の抗原特異的アレルギーに対しても、上記阻害剤を用いた免疫抑制による解決が有効であると考えられる。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA。

(a) 配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1、3、または16かに記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(c) 配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる、配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。

(d) 配列番号：1、3、または16に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。

2. 配列番号：2、4、または17に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA。

3. 請求項1または2に記載のDNAが挿入されたベクター。

4. 請求項1または2に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

5. 請求項1または2に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド。

6. 請求項4に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項5に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。

7. 請求項5に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 5 に記載の蛋白質またはその部分ペプチドに被験試料を接触させる工程、および

(b) 請求項 5 に記載の蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 請求項 5 に記載の蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

8. 請求項 5 に記載の蛋白質に結合する抗体。

9. 請求項 8 に記載の抗体と、請求項 5 に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含む、請求項 5 に記載の蛋白質の検出又は測定方法。

10. 配列番号：1、3 または 16 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

1 / 14

图 1

1 ttggtggttcattggtgatgttctatatctgtgtaagtagcaattgttcccaggacacatat
61 ggaagtctgttaataaaaaatgatatattttaaaatttgatttagagtgttactagttctta
121 aaaatgtaaaagtacactaggtagtgaagaggaaaaatgggaggataacgtgtggtctccc
181 tttagctttacgattgtctctgtctttagatggaagtcaacttcgctaagaaccgtaag
MetGluValAsnPheAlaLysAsnArgLys
241 gataaaaaccaaactgacaacctcacggggctgcaacctttatcacagaatatgtcatagct
AspLysAsnGlnThrTyrAsnLeuThrGlyLeuGlnProXxxThrGluTyrValIleAla
301 ctgcgatgtgcgggtcaaggaggtcaaagttctggagtgactggagccaagaaaaaatggga
LeuArgCysAlaValLysGluSerLysPheTrpSerAspTrpSerGlnGluLysMetGly
361 atgactgaggaagaaagcaagctacttccctgcgattcccgtcctgtctgctctgggtgtan
MetThrGluGluGluXxxLysLeuLeuProAlaIlePro
421 ggctgctctgcgctaaaacttgggtggtgtctgcaccaccg

2 / 14

2

hNR10
gp130

*

TYNLTGLQPFTEYVIALRCAVKESK-FWSDWSQEKMGMTIEE
SFTVQDLEKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSDEEASGIIYED

hNR10
hLIFR

*

LTGLQPFTEYVIALRCAVKESKFWSDWSQEKMGMTIEE
LDKLNPRYILYTFRRRCSTETFWKWSKSNKKQHLLTE

hNR10
OSMRB

*

NQTYNLTGLOPFTEYVIALRCAVKESE--WSDWSQEKMGMTIEE
NGEYFLESELEPPATEYMARVRC-DA\$HFWKWSDEWSGQNF-TLIE

hNR10
IL12R

*

AKNRKDKNQTYNLTGLOPFTEYVIALRCAVKESK-FWSDWSQEKMGMTIEE
AKGRHD-----LLDLKRPFTTEYEFQISSKHLHYKGSWSDWSDESLRAQIPEE

hNR10
hNR 6

*

NQTY-NLTGLQPFTEYVIALRC-----AVKESKFWSDWSQEKMGMTIEE
NQTSCLAGLKEPGTIVFVQVRCNPFGIYGSKKAGIWSFWSHPTAASIPRSC

3 / 1 4

3

1 CGCTTATAAATGAATGTGTGCTTAGGAACACCAGACAGCACTCCAGCACTCTGCTTGGGG
61 GGCATTGCAAACAGCAAAATCACTCATAAAAGGCAAAAAATTGCAAAAAAATAGTAATA
121 ACCAGCATGGTACTAAATAGACCATGAAAAGACATGTGTGTGCAGTATGAAAATTGAGAC
181 AGGAAGGCAGAGTGTCTAGCTTGTTCACCTCAGCTGGGAATGTGCATCAGGCAACTCAAG
241 TTTTTCACCACGGCATGTGTCTGTGAATGTCCGCAAAACATTTTAAACAATAATGCAATCC
301 ATTTCCCAGCATAAGTGGGTAAAGTGCCACTTTGACTTGGGCTGGGCTTAAAGCACAAGA
361 AAAGCTCGCAGACAATCAGAGTGGAAACACTCCACATCTTAGTGTGGATAAATTAAAGT
421 CCAGATTGTTCTTCCTGTCTGACTTGTGCTGTGGGAGGTGGAGTTGCCTTTGATGCAAA
481 TCCTTTGAGCCAGCAGAACATCTGTGGAACATCCCCTGATACATGAAGCTCTCTCCCCAG

MetLysLeuSerProGln
541 CCTTCATGTGTTAACCTGGGGATGATGTGGACCTGGGCACCTGTGGATGCTCCCTCACTC
ProSerCysValAsnLeuGlyMetMetTrpThrTrpAlaLeuTrpMetLeuProSerLeu
601 TGCAAATTCAGCCTGGCAGCTCTGCCAGCTAAGCCTGAGAACATTTCTGTGTCTACTAC
CysLysPheSerLeuAlaAlaLeuProAlaLysProGluAsnIleSerCysValTyrTyr
661 TATAGGAAAAATTTAACCTGCACTTGGAGTCCAGGAAAGGAAACAGTTATACCCAGTAC
TyrArgLysAsnLeuThrCysThrTrpSerProGlyLysGluThrSerTyrThrGlnTyr
721 ACAGTTAAGAGAACTTACGCTTTCGGAGAAAAACATGATAATTGTACAACCAATAGTTCT
ThrValLysArgThrTyrAlaPheGlyGluLysHisAspAsnCysThrThrAsnSerSer
781 ACAAGTGAATAATCGTGCTTCGTGCTCTTTTTTCTTCCAAGAATAACGATCCCAGATAAT
ThrSerGluAsnArgAlaSerCysSerPhePheLeuProArgIleThrIleProAspAsn
841 TATACCATTGAGGTGGAAGCTGAAAATGGAGATGGTGTAAATTAAATCTCATATGACATAC
TyrThrIleGluValGluAlaGluAsnGlyAspGlyValIleLysSerHisMetThrTyr
901 TGGAGATTAGAGAACATAGCGAAAACCTGAACCACCTAAGATTTTCCGTGTGAAACAGTT
TrpArgLeuGluAsnIleAlaLysThrGluProProLysIlePheArgValLysProVal
961 TTGGGCATCAAACGAATGATTCAAATTGAATGGATAAAGCCTGAGTTGGCGCCTGTTTCA
LeuGlyIleLysArgMetIleGlnIleGluTrpIleLysProGluLeuAlaProValSer
1021 TCTGATTTAAATACACACTTCGATTGAGGACAGTCAACAGTACCAGCTGGATGGAAGTC
SerAspLeuLysTyrThrLeuArgPheArgThrValAsnSerThrSerTrpMetGluVal
1081 AACTTCGCTAAGAACCGTAAGGATAAAACCAAACGTACAACCTCACGGGGCTGCAGCCT
AsnPheAlaLysAsnArgLysAspLysAsnGlnThrTyrAsnLeuThrGlyLeuGlnPro
1141 TTTACAGAATATGTCATAGCTCTGCGATGTGCGGTCAAGGAGTCAAAGTTCTGGAGTGAC
PheThrGluTyrValIleAlaLeuArgCysAlaValLysGluSerLysPheTrpSerAsp

4 / 14

☒ 4

1201 TGGAGCCAAGAAAAAATGGGAATGACTGAGGAAGAAGCTCCATGTGGCCTGGAAGTGTGG
TrpSerGlnGluLysMetGlyMetThrGluGluGluAlaProCysGlyLeuGluLeuTrp
1261 AGAGTCCTGAAACCAGCTGAGGCGGATGGAAGAAGGCCAGTCCGCTTGTATGGAAGAAG
ArgValLeuLysProAlaGluAlaAspGlyArgArgProValArgLeuLeuTrpLysLys
1321 GCAAGAGGAGCCCCAGTCCTAGAGAAAACACTTGGCTACAACATATGGTACTATCCAGAA
AlaArgGlyAlaProValLeuGluLysThrLeuGlyTyrAsnIleTrpTyrTyrProGlu
1381 AGCAACACTAACCTCACAGAAACAATGAACACTACTAACCAGCAGCTTGAAGTGCATCTG
SerAsnThrAsnLeuThrGluThrMetAsnThrThrAsnGlnGlnLeuGluLeuHisLeu
1441 GGAGGCGAGAGCTTTTGGGTGTCTATGATTTCTTATAATTCTCTTGGGAAGTCTCCAGTG
GlyGlyGluSerPheTrpValSerMetIleSerTyrAsnSerLeuGlyLysSerProVal
1501 GCCACCCTGAGGATTCCAGCTATTCAAGAAAAATCATTTCAGTGCATTGAGGTCATGCAG
AlaThrLeuArgIleProAlaIleGlnGluLysSerPheGlnCysIleGluValMetGln
1561 GCCTGCGTTGCTGAGGACCAGCTAGTGGTGAAGTGGCAAAGCTCTGCTCTAGACGTGAAC
AlaCysValAlaGluAspGlnLeuValValLysTrpGlnSerSerAlaLeuAspValAsn
1621 ACTTGGATGATTGAATGGTTTCCGGATGTGGACTCAGAGCCCACCACCCTTTCCTGGGAA
ThrTrpMetIleGluTrpPheProAspValAspSerGluProThrThrLeuSerTrpGlu
1681 TCTGTGTCTCAGGCCACGAAGTGGACGATCCAGCAAGATAAAATTAACCTTCTGCTGTC
SerValSerGlnAlaThrAsnTrpThrIleGlnGlnAspLysLeuLysProPheTrpCys
1741 TATAACATCTCTGTGTATCCAATGTTGCATGACAAAGTTGGCGAGCCATATCCATCCAG
TyrAsnIleSerValTyrProMetLeuHisAspLysValGlyGluProTyrSerIleGln
1801 GCTTATGCCAAAGAAGGCGTTCCATCAGAAGGTCCTGAGACCAAGGTGGAGAACATTGGC
AlaTyrAlaLysGluGlyValProSerGluGlyProGluThrLysValGluAsnIleGly
1861 GTGAAGACGGTCACGATCACATGGAAAGAGATTCCCAAGAGTGAGAGAAAGGGTATCATC
ValLysThrValThrIleThrTrpLysGluIleProLysSerGluArgLysGlyIleIle
1921 TGCAACTACACCATCTTTTACCAAGCTGAAGGTGGAAGGATTCTCCAAGACAGTCAAT
CysAsnTyrThrIlePheTyrGlnAlaGluGlyGlyLysGlyPheSerLysThrValAsn
1981 TCCAGCATCTTGCAGTACGGCCTGGAGTCCCTGAAACGAAAGACCTCTTACATTGTTTCAG
SerSerIleLeuGlnTyrGlyLeuGluSerLeuLysArgLysThrSerTyrIleValGln
2041 GTCATGGCCAACACCAAGTGTGGGGGAACCAACGGGACCAGCATAAATTTCAAGACATTG
ValMetAlaAsnThrSerAlaGlyGlyThrAsnGlyThrSerIleAsnPheLysThrLeu
2101 TCATTCAAGTGTCTTTGAGATTATCCTCATAACTTCTCTGATTGGTGGAGGCCTTCTTATT
SerPheSerValPheGluIleIleLeuIleThrSerLeuIleGlyGlyGlyLeuLeuIle

5 / 14

5

2161 CTCATTATCCTGACAGTGGCATATGGTCTCAAAAAACCCAACAAATTGACTCATCTGTGT
LeuIleIleLeuThrValAlaTyrGlyLeuLysLysProAsnLysLeuThrHisLeuCys
2221 TGGCCACCGTTCCCAACCCTGCTGAAAGTAGTATAGCCACATGGCATGGAGATGATTTC
TrpProThrValProAsnProAlaGluSerSerIleAlaThrTrpHisGlyAspAspPhe
2281 AAGGATAAGCTAAACCTGAAGGAGTCTGATGACTCTGTGAACACAGAAGACAGGATCTTA
LysAspLysLeuAsnLeuLysGluSerAspAspSerValAsnThrGluAspArgIleLeu
2341 AAACCATGTTCCACCCCCAGTGACAAGTTGGTGATTGACAAGTTGGTGGTGAACCTTTGGG
LysProCysSerThrProSerAspLysLeuValIleAspLysLeuValValAsnPheGly
2401 AATGTTCTGCAAGAAATTTTCACAGATGAAGCCAGAACGGGTCAGGAAAAACAATTTAGG
AsnValLeuGlnGluIlePheThrAspGluAlaArgThrGlyGlnGluLysGlnPheArg
2461 AGGGGAAAAGAATGGGACTAGAATTCTGTCTTCCTGCCCAACTTCAATATAAGTGTGGAC
ArgGlyLysGluTrpAsp***
2521 TAAAATGCGAGAAAGGTGTCCTGTGGTCTATGCAAATTAGAAAGGACATGCAGAGTTTTTC
2581 CAACTAGGAAGACTGAATCTGTGGCCCCAAGAGAACCATCTCCGAAGACTGGGTATGTGG
2641 TCTTTTCCACACATGGACCACCTACGGATGCAATCTGTAATGCATGTGCATGAGAAGTCT
2701 GTTATTAAGTAGAGTGTGAAAACATGGTTATGGTAATAGGAACAGCTTTTAAATGCTTT
2761 TGTATTTGGGCCTTTCACACAAAAAGCCATAATACCATTTTCATGTAATGCTATACTTC
2821 TATACTATTTTCATGTAATACTATACTTCTATACTATTTTCATGTAATACTATACTTCTA
2881 TACTATTTTCATGTAATACTATACTTCTATATTAAAGTTTTACCCACTCCAAAAAAGAA
2941 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

6 / 14

6

1 CGCTTATAAATGAATGTGTGCTTAGGAACACCAGACAGCACTCCAGCACTCTGCTTGGGG
61 GGCATTGAAACAGCAAAATCACTCATAAAGGCAAAAAATGCAAAAAATAGTAATA
121 ACCAGCATGGTACTAAATAGACCATGAAAAGACATGTGTGTGCAGTATGAAAATTGAGAC
181 AGGAAGGCAGAGTGTGAGCTTGTTCCACCTCAGCTGGGAATGTGCATCAGGCAACTCAAG
241 TTTTTCACCACGGCATGTGTCTGTGAATGTCCGCAAAACATTTTAAACAATAATGCAATCC
301 ATTTCCAGCATAAGTGGTAAGTGCCACTTTGACTTGGGCTGGGCTTAAAAGCACAGA
361 AAAGCTCGCAGACAATCAGAGTGGAAACACTCCCACATCTTAGTGTGGATAAATTAAAGT
421 CCAGATTGTTCTTCTGTCTGACTTGTGCTGTGGGAGGTGGAGTTGCCTTTGATGCAA
481 TCCTTTGAGCCAGCAGAACATCTGTGGAACATCCCCTGATACATGAAGCTCTCTCCCCAG
MetLysLeuSerProGln
541 CCTTCATGTGTTAACCTGGGGATGATGTGGACCTGGGCACTGTGGATGCTCCCCTCACTC
ProSerCysValAsnLeuGlyMetMetTrpThrTrpAlaLeuTrpMetLeuProSerLeu
601 TGCAAATTCAGCCTGGCAGCTCTGCCAGCTAAGCCTGAGAACATTTCTGTGTCTACTAC
CysLysPheSerLeuAlaAlaLeuProAlaLysProGluAsnIleSerCysValTyrTyr
661 TATAGGAAAAATTTAACCTGCACTTGGAGTCCAGGAAAGGAAACCAGTTATACCCAGTAC
TyrArgLysAsnLeuThrCysThrTrpSerProGlyLysGluThrSerTyrThrGlnTyr
721 ACAGTTAAGAGAACTTACGCTTTCGGAGAAAAACATGATAATTGTACAACCAATAGTTCT
ThrValLysArgThrTyrAlaPheGlyGluLysHisAspAsnCysThrThrAsnSerSer
781 ACAAGTGAAATCGTGCTTCGTGCTCTTTTTTCCTTCCAAGAATAACGATCCCAGATAAT
ThrSerGluAsnArgAlaSerCysSerPhePheLeuProArgIleThrIleProAspAsn
841 TATACCATTGAGGTGGAAGCTGAAAATGGAGATGGTGTAATTAAATCTCATATGACATAC
TyrThrIleGluValGluAlaGluAsnGlyAspGlyValIleLysSerHisMetThrTyr
901 TGGAGATTAGAGAACATAGCGAAAACCTGAACCACCTAAGATTTTCCGTGTGAAACCAGTT
TrpArgLeuGluAsnIleAlaLysThrGluProProLysIlePheArgValLysProVal
961 TTGGGCATCAAACGAATGATTCAAATTGAATGGATAAAGCCTGAGTTGGCGCTGTTTCA
LeuGlyIleLysArgMetIleGlnIleGluTrpIleLysProGluLeuAlaProValSer
1021 TCTGATTTAAATACACACTTCGATTGAGGACAGTCAACAGTACCAGCTGGATGGAAGTC
SerAspLeuLysTyrThrLeuArgPheArgThrValAsnSerThrSerTrpMetGluVal
1081 AACTTCGCTAAGAACCCTAAGGATAAAAACCAAACGTACAACCTCACGGGGCTGCAGCCT
AsnPheAlaLysAsnArgLysAspLysAsnGlnThrTyrAsnLeuThrGlyLeuGlnPro
1141 TTTACAGAATATGTCATAGCTCTGCGATGTGCGGTCAAGGAGTCAAAGTTCTGGAGTGAC
PheThrGluTyrValIleAlaLeuArgCysAlaValLysGluSerLysPheTrpSerAsp

7 / 14

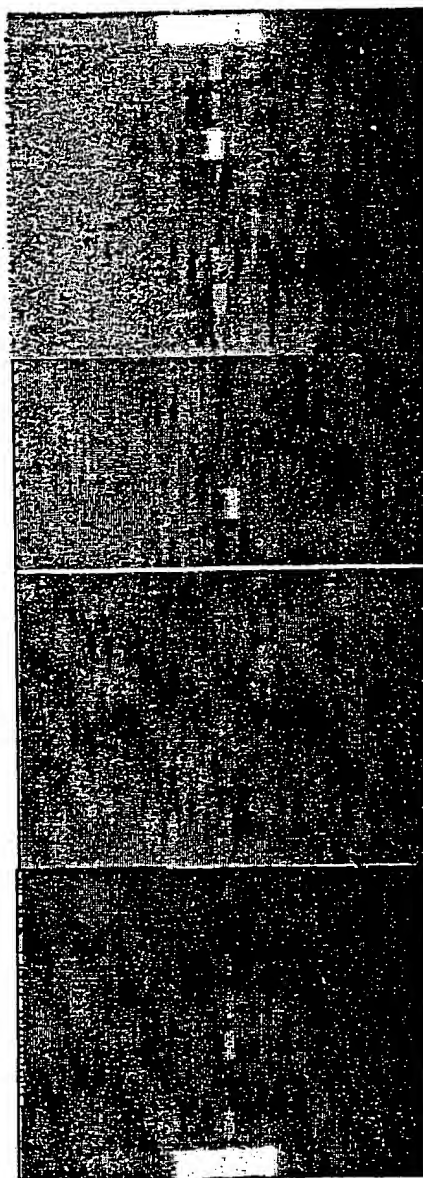
7

1201 TGGAGCCAAGAAAAAATGGGAATGACTGAGGAAGAAGGCAAGCTACTCCCTGCGATTCCC
TrpSerGlnGluLysMetGlyMetThrGluGluGluGlyLysLeuLeuProAlaIlePro
1261 GTCCTGTCTACTCTGGTGTAGGGCTGCTTTGGGCTAGACTTGGTGGGGTTTGTCAACCACC
ValLeuSerThrLeuVal***
1321 TGGTTGGGAATCATGGAATCTCATGACCCAGGGGCCCCCTGTACCATCGAGAGTGAGCC
1381 TGCACAACTTTGTGCCCCAAAGGCAAAGGATCACATTTTAATACTCATGAGGTTCTTATA
1441 CTATACATGAAAGGGTATCATATCATTGTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAGATGGAGTC
1501 TTA CTCTGTCAACCAGGATGGAGTGCAGTGATGTGATCTCGGCTCACTGCCACCACCACC
1561 TCCCGAGTTCAAGCAATTCTTGTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAGGGGCCC
1621 ACGACCATGCCCGGTTGATTTTTGTATTTTTAGTAGAGAAGGGATATCACCATGTTGGCT
1681 AGGCTAGTCTTGAACCTCTGACCTCAGGTAATCTGCCCACCTTGACCTCCCAAAGTGTTG
1741 GGATTACAGGCGTGAGCCACTGTGCCCCGCCAGTATCATATCATCTGAAGGTATCCTGTG
1801 ATAAATTAAAGATACATATTGTGAATCCTGGAGCTACTACTCAAAAAATAAATAAAGGTG
1861 TAACTAATACAATTTAAAAAATCACATTTTTAATGACAGTGAGGAAAGGAAAGAGGCATG
1921 GATTGCAGGTTGATGGAGTGCTTACTAAGTGTCAGTATGGTCATTAAGAGCAACGCTTCC
1981 AGTCAGTGGCCTTGGCTTAAATCCCAAGCCAGGTGTCTTTGGGCAAGATACCTAAACTCT
2041 CAGTTCATTCTCAGCAGTTTCCTCGCATTATTCCCCTTTTCTATATTGAAATAGAATAT
2101 GTAAGTTGAGTTTATAGTAGTACCTATTTTTTAGTATTATTTTAAAGATTAAATGAAATA
2161 ATGTGTTTAGCCCATAGTAGATATTTCACTAACTGCTAGACTTCCTATTCTTATTATTTAT
2221 CCTCCTACTATTATTTTAAATCCTCCTTAAAGCACTATAAAATATGTAGAGTCACTCCCA
2281 TTTTGGAAATGAGGAACTGAGTTTCAGAGATGCTAATAAACAGCTCAGGGTCACTCAGC
2341 ATGTGTTACTTTTCTCAAGAGCCTTGCCCAGAGTCTGACCCCTCAGTGGACGATCAATAAA
2401 TGTGTGATGAATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

8 / 14

図 8

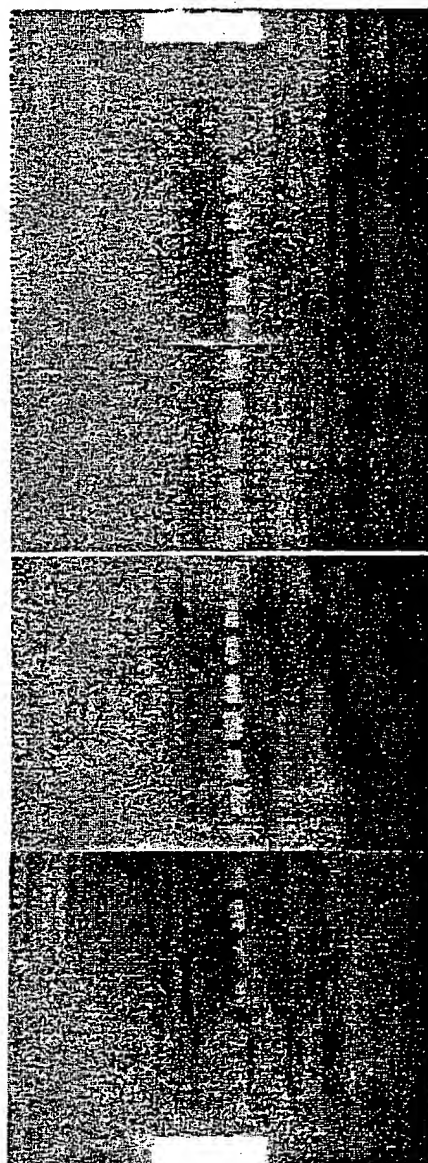
胎児胸腺
 胎児脾臓
 胎児骨格筋
 胎児肺
 胎児肝臓
 胎児腎臓
 胎児心臓
 胎児脳
 大腸
 小腸
 卵巣
 精巣
 前立腺
 脾臓
 腎臓
 骨格筋
 肝臓
 肺
 胎盤
 脳
 心臓
 扁桃
 胎児肝臓
 骨髓
 末梢血白血球
 胸腺
 リンパ節
 脾臓



9 / 14

図 9

胎児胸腺
胎児脾臓
胎児骨格筋
胎児肺
胎児肝臓
胎児腎臓
胎児心臓
胎児脳
大腸
小腸
卵巢
精巣
前立腺
脾臓
腎臓
骨格筋
肝臓
肺
胎盤
脳
心臓
扁桃
胎児肝臓
骨髓
末梢血白血球
胸腺
リンパ節
脾臓



10/14

図10

胎児胸腺
胎児脾臓
胎児骨格筋
胎児肺
胎児肝臓
胎児腎臓
胎児心臓
胎児脳
大腸
小腸
卵巣
精巣
前立腺
脾臓
腎臓
骨格筋
肝臓
肺
胎盤
脳
心臓
扁桃
胎児肝臓
骨髓
末梢血白血球
胸腺
リンパ節
脾臓



11/14

図 11

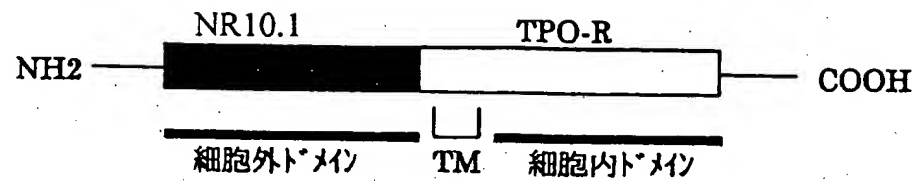
胎児胸腺
胎児脾臓
胎児骨格筋
胎児肺
胎児肝臓
胎児腎臓
胎児心臓
胎児脳
大腸
小腸
卵巣
精巣
前立腺
脾臓
腎臓
骨格筋
肝臓
肺
胎盤
脳
心臓
扁桃
胎児肝臓
骨髓
末梢血白血球
胸腺
リンパ節
脾臓



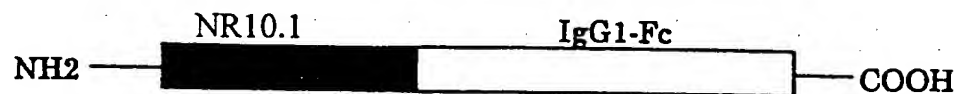
12 / 14

図 12

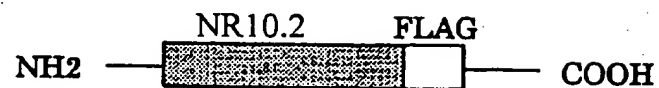
pEF-NR10/TPO-R



pET-NR10/IgG-Fc



pEF-BOS/NR10.2FLAG



1 3 / 1 4

☒ 1 3

1 CCCCTGATACATGAAGCTCTCTCCCCAGCCTTCATGTGTTAACCTGGGGATGATGTGGAC
MetLysLeuSerProGlnProSerCysValAsnLeuGlyMetMetTrpThr
61 CTGGGCACTGTGGATGCTCCCTCACTCTGCAAATTCAGCCTGGCAGCTCTGCCAGCTAA
TrpAlaLeuTrpMetIleuProSerLeuCysLysPheSerLeuAlaAlaLeuProAlaLys
121 GCCTGAGAACATTTCTGTGTCTACTACTATAGGAAAAATTTAACCTGCACTTGGAGTCC
ProGluAsnIleSerCysValTyrTyrTyrArgLysAsnLeuThrCysThrTrpSerPro
181 AGGAAAGGAAACCAAGTTATACCCAGTACACAGTTAAGAGAACTTACGCTTTTGGAGAAAA
GlyLysGluThrSerTyrThrGlnTyrThrValLysArgThrTyrAlaPheGlyGluLys
241 ACATGATAATTGTACAACCAATAGTTCTACAAGTGAAAATCGTGCTTCGTGCTCTTTTTT
HisAspAsnCysThrThrAsnSerSerThrSerGluAsnArgAlaSerCysSerPhePhe
301 CCTTCCAAGAATAACGATCCAGATAATTATACCATTGAGGTGGAAGCTGAAAATGGAGA
LeuProArgIleThrIleProAspAsnTyrThrIleGluValGluAlaGluAsnGlyAsp
361 TGGTGTAATTAAATCTCATATGACATACTGGAGATTAGAGAACATAGCGAAAACCTGAACC
GlyValIleLysSerHisMetThrTyrTrpArgLeuGluAsnIleAlaLysThrGluPro
421 ACCTAAGATTTTCCGTGTGAAACCAGTTTTGGGCATCAAACGAATGATTCAAATTGAATG
ProLysIlePheArgValLysProValLeuGlyIleLysArgMetIleGlnIleGluTrp
481 GATAAAGCCTGAGTTGGCGCCTGTTTCATCTGATTTAAAATACACACTTCGATTACAGGAC
IleLysProGluLeuAlaProValSerSerAspLeuLysTyrThrLeuArgPheArgThr
541 AGTCAACAGTACCAGCTGGATGGAAGTCAACTTCGCTAAGAACCGTAAGGATAAAAACCA
ValAsnSerThrSerTrpMetGluValAsnPheAlaLysAsnArgLysAspLysAsnGln
601 AACGTACAACCTCACGGGGCTGCAGCCTTTTACAGAATATGTCATAGCTCTGCGATGTGC
ThrTyrAsnLeuThrGlyLeuGlnProPheThrGluTyrValIleAlaLeuArgCysAla
661 GGTCAAGGAGTCAAAGTTCTGGAGTGACTGGAGCCAAGAAAAAATGGGAATGACTGAGGA
ValLysGluSerLysPheTrpSerAspTrpSerGlnGluLysMetGlyMetThrGluGlu
721 AGAAGCTCCATGTGGCCTGGAACCTGTGGAGAGTCTGAAACCAGCTGAGGCGGATGGAAG
GluAlaProCysGlyLeuGluLeuTrpArgValLeuLysProAlaGluAlaAspGlyArg
781 AAGGCCAGTGCGGTTGTTATGGAAGAAGGCAAGAGGAGCCCCAGTCTAGAGAAAACACT
ArgProValArgLeuLeuTrpLysLysAlaArgGlyAlaProValLeuGluLysThrLeu
841 TGGCTACAACATATGGTACTATCCAGAAAGCAACACTAACCTCACAGAAACAATGAACAC
GlyTyrAsnIleTrpTyrTyrProGluSerAsnThrAsnLeuThrGluThrMetAsnThr
901 TACTAACCAGCAGCTTGAACCTGCATCTGGGAGGCGAGAGCTTTTGGGTGTCTATGATTC
ThrAsnGlnGlnLeuGluLeuHisLeuGlyGlyGluSerPheTrpValSerMetIleSer
961 TTATAATTCTCTTGGGAAGTCTCCAGTGGCCACCCTGAGGATTCCAGCTATTCAAGAAAA
TyrAsnSerLeuGlyLysSerProValAlaThrLeuArgIleProAlaIleGlnGluLys
1021 ATCATTTTCAGTGCATTGAGGTCATGCAGGCCTGCGTTGCTGAGGACCAGCTAGTGGTGAA

14 / 14

14

SerPheGlnCysIleGluValMetGlnAlaCysValAlaGluAspGlnLeuValValLys
1081 GTGGCAAAGCTCTGCTCTAGACGTGAACACTTGGATGATTGAATGGTTTCCGGATGTGGA
TrpGlnSerSerAlaLeuAspValAsnThrTrpMetIleGluTrpPheProAspValAsp
1141 CTCAGAGCCCACCACCCTTTCCTGGGAATCTGTGTCTCAGGCCACGAACTGGACGATCCA
SerGluProThrThrLeuSerTrpGluSerValSerGlnAlaThrAsnTrpThrIleGln
1201 GCAAGATAAATTAAACCTTTCTGGTGTCTATAACATCTCTGTGTATCCAATGTTGCATGA
GlnAspLysLeuLysProPheTrpCysTyrAsnIleSerValTyrProMetLeuHisAsp
1261 CAAAGTTGGCGAGCCATATTCCATCCAGGCTTATGCCAAAGAAGGCGTTCCATCAGAAGG
LysValGlyGluProTyrSerIleGlnAlaTyrAlaLysGluGlyValProSerGluGly
1321 TCCTGAGACCAAGGTGGAGAACATTGGCGTGAAGACGGTCACGATCACATGGAAAGAGAT
ProGluThrLysValGluAsnIleGlyValLysThrValThrIleThrTrpLysGluIle
1381 TCCCAAGAGTGAGAGAAAGGTATCATCTGCAACTACACCATCTTTTACCAAGCTGAAGG
ProLysSerGluArgLysGlyIleIleCysAsnTyrThrIlePheTyrGlnAlaGluGly
1441 TGGAAAAGGATTCTCCAAGACAGTCAATTCAGCATCTTGAGTACGGCCTGGAGTCCCT
GlyLysGlyPheSerLysThrValAsnSerSerIleLeuGlnTyrGlyLeuGluSerLeu
1501 GAAACGAAAGACCTCTTACATTGTTTCAAGTTCAGGTCATGGCCAGCACCAGTCTGGGGGAACCAA
LysArgLysThrSerTyrIleValGlnValMetAlaSerThrSerAlaGlyGlyThrAsn
1561 CGGGACCAGCATAAATTTCAAGACATTGTCATTCAGTGTCTTTGAGATTATCCTCATAAC
GlyThrSerIleAsnPheLysThrLeuSerPheSerValPheGluIleIleLeuIleThr
1621 TTCTCTGATTGGTGGAGGCCTTCTTATTCTCATTATCCTGACAGTGGCATATGGTCTCAA
SerLeuIleGlyGlyGlyLeuLeuIleLeuIleIleLeuThrValAlaTyrGlyLeuLys
1681 AAAACCCCAACAAATTGACTCATCTGTGTGGCCACCCTGCCAACCTGCTGAAAGTAG
LysProAsnLysLeuThrHisLeuCysTrpProThrValProAsnProAlaGluSerSer
1741 TATAGCCACATGGCATGGAGATGATTCAAGGATAAGCTAAACCTGAAGGAGTCTGATGA
IleAlaThrTrpHisGlyAspAspPheLysAspLysLeuAsnLeuLysGluSerAspAsp
1801 CTCTGTGAACACAGAAGACAGGATCTTAAACCATGTTCCACCCCCAGTGACAAGTTGGT
SerValAsnThrGluAspArgIleLeuLysProCysSerThrProSerAspLysLeuVal
1861 GATTGACAAGTTGGTGGTGAACCTTGGGAATGTTCTGCAAGAAATTTTACAGATGAAGC
IleAspLysLeuValValAsnPheGlyAsnValLeuGlnGluIlePheThrAspGluAla
1921 CAGAACGGGTCAGGAAAACAATTTAGGAGGGGAAAAGAATGGGACTAGAATTCTGTCTTC
ArgThrGlyGlnGluAsnAsnLeuGlyGlyGluLysAsnGlyThrArgIleLeuSerSer
1981 CTGCCCAACTTCAATATAAGTGTGGACTAAAATGCGAGAAAGGTGTCCTGTGGTCTATGC
CysProThrSerIle***
2041 AAATTAGAAAGGACATGCAGAGTTTTCCAAGTAGGAAGACTGAATCTGTGGCCCCAAGAG
2101 AACCATCTCCGAAGACTGG

1/41

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> NOVEL HEMOPOIETIN RECEPTOR PROTEIN, NR10

<130> C2-105DP1PCT

<140>

<141>

<150> JP1999-155797

<151> 1999-06-02

<150> JP1999-217797

<151> 1999-07-30

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2969

<212> DNA

<213> Homo sapiens

2/41

<220>

<221> CDS

<222> (523)..(2478)

<400> 1

cgcttataaa tgaatgtgtg cttaggaaca ccagacagca ctccagcact ctgcttgggg 60

ggcattcgaa acagcaaaat cactcataaa aggcaaaaaa ttgcaaaaaa aatagtaata 120

accagcatgg tactaaatag accatgaaaa gacatgtgtg tgcagtatga aaattgagac 180

aggaaggcag agtgtcagct tgttccacct cagctgggaa tgtgcatcag gcaactcaag 240

ttttcacca cggcatgtgt ctgtgaatgt ccgcaaaaca ttttaacaat aatgcaatcc 300

atttcccagc ataagtgggt aagtgccact ttgacttggg ctgggcctta aagcacaaga 360

aaagctcgca gacaatcaga gtggaacac tcccacatct tagtgtggat aaattaaagt 420

ccagattgtt cttcctgtcc tgacttgtgc tgtgggaggt ggagttgcct ttgatgcaaa 480

tcctttgagc cagcagaaca tctgtggaac atcccctgat ac atg aag ctc tct 534

Met Lys Leu Ser

1

ccc cag cct tca tgt gtt aac ctg ggg atg atg tgg acc tgg gca ctg 582

3/41

Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp Thr Trp Ala Leu
 5 10 15 20

tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gct ctg cca gct 630
 Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala
 25 30 35

aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg aaa aat tta acc 678
 Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr
 40 45 50

tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc cag tac aca gtt 726
 Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val
 55 60 65

aag aga act tac gct ttc gga gaa aaa cat gat aat tgt aca acc aat 774
 Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn Cys Thr Thr Asn
 70 75 80

agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg tgc tct ttt ttc ctt cca aga 822
 Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg
 85 90 95 100

ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa gct gaa aat gga 870
 Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly
 105 110 115

4/41

gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga tta gag aac ata 918
Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile
120 125 130

gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa cca gtt ttg ggc 966
Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys Pro Val Leu Gly
135 140 145

atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct gag ttg gcg cct 1014
Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro
150 155 160

gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg aca gtc aac agt 1062
Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser
165 170 175 180

acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt aag gat aaa aac 1110
Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn
185 190 195

caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca gaa tat gtc ata 1158
Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile
200 205 210

gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg agt gac tgg agc 1206

5/41

Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser

215

220

225

caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa gct cca tgt ggc ctg gaa 1254

Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu

230

235

240

ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag gcg gat gga aga agg cca gtg 1302

Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val

245

250

255

260

cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga gcc cca gtc cta gag aaa aca 1350

Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr

265

270

275

ctt ggc tac aac ata tgg tac tat cca gaa agc aac act aac ctc aca 1398

Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr

280

285

290

gaa aca atg aac act act aac cag cag ctt gaa ctg cat ctg gga ggc 1446

Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu His Leu Gly Gly

295

300

305

gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct tat aat tct ctt ggg aag tct 1494

Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser

310

315

320

6/41

cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct att caa gaa aaa tca ttt cag 1542

Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln

325 330 335 340

tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt gct gag gac cag cta gtg gtg 1590

Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp Gln Leu Val Val

345 350 355

aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg aac act tgg atg att gaa tgg 1638

Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp

360 365 370

ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc acc ctt tcc tgg gaa tct gtg 1686

Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val

375 380 385

tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag caa gat aaa tta aaa cct ttc 1734

Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe

390 395 400

tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca atg ttg cat gac aaa gtt ggc 1782

Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His Asp Lys Val Gly

405 410 415 420

gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc aaa gaa ggc gtt cca tca gaa 1830

7/41

Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu

425

430

435

ggt cct gag acc aag gtg gag aac att ggc gtg aag acg gtc acg atc 1878

Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys Thr Val Thr Ile

440

445

450

aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag aga aag ggt atc atc tgc aac 1926

Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn

455

460

465

tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gga ttc tcc aag aca 1974

Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr

470

475

480

gtc aat tcc agc atc ttg cag tac ggc ctg gag tcc ctg aaa cga aag 2022

Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys

485

490

495

500

acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc aac acc agt gct ggg gga acc 2070

Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Asn Thr Ser Ala Gly Gly Thr

505

510

515

aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca ttc agt gtc ttt gag 2118

Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu

520

525

530

8/41

att atc ctc ata act tct ctg att ggt gga ggc ctt ctt att ctc att 2166

Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile

535

540

545

atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc aaa aaa ccc aac aaa ttg act cat 2214

Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn Lys Leu Thr His

550

555

560

ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac cct gct gaa agt agt ata gcc aca 2262

Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr

565

570

575

580

tgg cat gga gat gat ttc aag gat aag cta aac ctg aag gag tct gat 2310

Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp

585

590

595

gac tct gtg aac aca gaa gac agg atc tta aaa cca tgt tcc acc ccc 2358

Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro

600

605

610

agt gac aag ttg gtg att gac aag ttg gtg gtg aac ttt ggg aat gtt 2406

Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Gly Asn Val

615

620

625

ctg caa gaa att ttc aca gat gaa gcc aga acg ggt cag gaa aaa caa 2454

9/41

Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr Gly Gln Glu Lys Gln

630

635

640

ttt agg agg gga aaa gaa tgg gac tagaattctg tcttctgcc caacttcaat 2508

Phe Arg Arg Gly Lys Glu Trp Asp

645

650

ataagtgtgg actaaaatgc gagaaaggtg tcctgtggtc tatgcaaatt agaaaggaca 2568

tgcagagttt tccaactagg aagactgaat ctgtggcccc aagagaacca tctccgaaga 2628

ctgggtatgt ggtcttttcc acacatggac cacctacgga tgcaatctgt aatgcatgtg 2688

catgagaagt ctgttattaa gtagagtgtg aaaacatggg tatggttaata ggaacagctt 2748

ttaaaatgct ttgtatttg ggcctttcac acaaaaaagc cataatacca tttcatgta 2808

atgctatact tctatactat tttcatgtaa tactatactt ctatactatt ttcatgtaat 2868

actatacttc tatactattt tcatgtaata ctatacttct atattaaagt tttaccact 2928

ccaaaaaag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

2969

<210> 2

<211> 652

10/41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp

1 5 10 15

Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala

20 25 30

Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg

35 40 45

Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr

50 55 60

Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn

65 70 75 80

Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe

85 90 95

Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu

100 105 110

Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg

11/41

115

120

125

Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys

130

135

140

Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro

145

150

155

160

Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg

165

170

175

Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg

180

185

190

Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr

195

200

205

Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp

210

215

220

Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro

225

230

235

240

Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly

245

250

255

12/41

Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val

260

265

270

Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn

275

280

285

Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu

290

295

300

His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser

305

310

315

320

Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu

325

330

335

Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp

340

345

350

Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp

355

360

365

Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser

370

375

380

Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys

385

390

395

400

13/41

Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His

405

410

415

Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly

420

425

430

Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys

435

440

445

Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly

450

455

460

Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly

465

470

475

480

Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser

485

490

495

Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Asn Thr Ser

500

505

510

Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe

515

520

525

Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu

14/41

530 535 540
Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn
545 550 555 560
Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser
565 570 575
Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu
580 585 590
Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro
595 600 605
Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn
610 615 620
Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr Gly
625 630 635 640
Gln Glu Lys Gln Phe Arg Arg Gly Lys Glu Trp Asp
645 650

<210> 3

<211> 2440

15/41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (523)..(1278)

<400> 3

cgcttataaa tgaatgtgtg cttaggaaca ccagacagca ctccagcact ctgcttgggg 60

ggcattcgaa acagcaaaat cactcataaa aggcaaaaaa ttgcaaaaaa aatagtaata 120

accagcatgg tactaaatag accatgaaaa gacatgtgtg tgcagtatga aaattgagac 180

aggaaggcag agtgtcagct tgttccacct cagctgggaa tgtgcatcag gcaactcaag 240

tttttcacca cggcatgtgt ctgtgaatgt ccgcaaaaca ttttaacaat aatgcaatcc 300

atttcccagc ataagtgggt aagtgccact ttgacttggg ctgggcttaa aagcacaaga 360

aaagctcgca gacaatcaga gtggaaacac tcccacatct tagtgtggat aaattaaagt 420

ccagattgtt cttcctgtcc tgacttgtgc tgtgggaggt ggagttgcct ttgatgcaa 480

tcctttgagc cagcagaaca tctgtggaac atcccctgat ac atg aag ctc tct 534

Met Lys Leu Ser

16/41

1

ccc cag cct tca tgt gtt aac ctg ggg atg atg tgg acc tgg gca ctg 582

Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp Thr Trp Ala Leu

5 10 15 20

tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gct ctg cca gct 630

Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala

25 30 35

aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg aaa aat tta acc 678

Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr

40 45 50

tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc cag tac aca gtt 726

Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val

55 60 65

aag aga act tac gct ttc gga gaa aaa cat gat aat tgt aca acc aat 774

Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn Cys Thr Thr Asn

70 75 80

agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg tgc tct ttt ttc ctt cca aga 822

Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg

85 90 95 100

17/41

ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa gct gaa aat gga 870

Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly

105

110

115

gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga tta gag aac ata 918

Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile

120

125

130

gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa cca gtt ttg ggc 966

Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys Pro Val Leu Gly

135

140

145

atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct gag ttg gcg cct 1014

Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro

150

155

160

gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg aca gtc aac agt 1062

Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser

165

170

175

180

acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt aag gat aaa aac 1110

Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn

185

190

195

caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca gaa tat gtc ata 1158

Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile

18/41

200

205

210

gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg agt gac tgg agc 1206

Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser

215

220

225

caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa ggc aag cta ctc cct gcg 1254

Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Gly Lys Leu Leu Pro Ala

230

235

240

att ccc gtc ctg tct act ctg gtg tagggctgct ttgggctaga cttggtggg 1308

Ile Pro Val Leu Ser Thr Leu Val

245

250

ttgtcacca cctggttggg aatcatggaa tctcatgacc ccagggggccc cctgtacat 1368

cgagagtggag cctgcacaac ttgtgcccc aaaggcaaag gatcacattt taatactcat 1428

gaggttctta tactatacat gaaaggttat catatcattt gttttgtttt gttttgtttt 1488

tgagatggag tcttactctg tcaccagga tggagtgcag tgatgtgac tcggtcact 1548

gccaccacca cctcccgagt tcaagcaatt cttgtgcctc agcctcccaa gtagctggga 1608

ttacaggggc ccacgaccat gcccggtga tttttgtatt tttagtagag aagggatatc 1668

19/41

accatgttgg ctaggctagt cttgaactcc tgacctcagg taatctgecc accttgacct 1728

cccaaagtgt tgggattaca ggcgtgagcc actgtgcccc gccagtatca tatcatctga 1788

aggtatcctg tgataaatta aagatacata ttgtgaatcc tggagctact actcaaaaaa 1848

taaataaagg tgtaactaat acaatttaaa aaatcacatt tttaatgaca gtgaggaaag 1908

gaaagaggca tggattgcag gttgatggag tgcttactaa gtgtcagtat ggtcattaag 1968

agcaacgctt ccagtcagtg gccttggtt aaatcccaag ccaggtgtct ttgggcaaga 2028

tacctaaact ctcagttcat tctcagcagt ttcctgcgat ttattccctt ttctatatt 2088

gaaatagaat atgtaagttg agtttatagt agtacctatt ttttagtatt attttaaaga 2148

ttaaataaaa taatgtgttt agcccatagt agatattcac taactgctag acttcctatt 2208

cttattattt atcctcctac tattattttt aatcctcctt aaagcactat aaaatatgta 2268

gagtcactcc cattttggaa atgaggaaac tgagtttcag agatgctaataaacagctca 2328

gggtcactca gcatgtgtta cttttctcaa gagccttgcc cagagtctga ccctcagtgg 2388

acgatcaata aatgtgtgat gaatggaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

2440

20/41

<210> 4

<211> 252

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp

1 5 10 15

Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala

20 25 30

Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg

35 40 45

Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr

50 55 60

Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn

65 70 75 80

Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe

85 90 95

Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu

21/41

100

105

110

Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg

115

120

125

Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys

130

135

140

Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro

145

150

155

160

Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg

165

170

175

Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg

180

185

190

Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr

195

200

205

Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp

210

215

220

Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Gly Lys

225

230

235

240

22/41

Leu Leu Pro Ala Ile Pro Val Leu Ser Thr Leu Val

245

250

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 5

atggaagtca acttcgctaa gaaccgtaag

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

23/41

<400> 6

ccaaacgtac aacctcacgg ggctgcaacc

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 7

gtcatagctc tgcgatgtgc ggtcaaggag

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

24/41

<400> 8

agtagcttgc gttcttcctc agctattccc

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 9

ctttgactcc ttgaccgcac atcgcagagc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

25/41

<400> 10

ggttgcagcc ccgtgaggtt gtacgtttgg

30

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Syntthesized Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 11

atcagatgaa acaggcgcca actcagg

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Syntthesized Oligonucleotide Primer Sequence

26/41

<400> 12

tggtttcaca cggaaaatct taggtgg

27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 13

gcattcagga cagtcaacag taccagc

27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

27/41

<400> 14

agctggaatc ctcagggtgg ccactgg

27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 15

gcccatcacc agagtagaca ggacggg

27

<210> 16

<211> 2119

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(1996)

28/41

<400> 16

cccctgatac atg aag ctc tct ccc cag cct tca tgt gtt aac ctg ggg 49

Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly

1

5

10

atg atg tgg acc tgg gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc 97

Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe

15

20

25

agc ctg gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac 145

Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr

30

35

40

45

tac tat agg aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc 193

Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr

50

55

60

agt tat acc cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa 241

Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys

65

70

75

cat gat aat tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tcg 289

His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser

80

85

90

tgc tct ttt ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att 337

29/41

Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile

95

100

105

gag gtg gaa gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca 385

Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr

110

115

120

125

tac tgg aga tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc 433

Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe

130

135

140

cgt gtg aaa cca gtt ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg 481

Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp

145

150

155

ata aag cct gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt 529

Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu

160

165

170

cga ttc agg aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct 577

Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala

175

180

185

aag aac cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag 625

Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln

190

195

200

205

30/41

cct ttt aca gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca 673
Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser
210 215 220

aag ttc tgg agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa 721
Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu
225 230 235

gaa gct cca tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag 769
Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu
240 245 250

gcg gat gga aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga 817
Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly
255 260 265

gcc cca gtc cta gag aaa aca ctt ggc tac aac ata tgg tac tat cca 865
Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro
270 275 280 285

gaa agc aac act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag 913
Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln
290 295 300

ctt gaa ctg cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct 961

31/41

Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser

305

310

315

tat aat tct ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct 1009

Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala

320

325

330

att caa gaa aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt 1057

Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val

335

340

345

gct gag gac cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg 1105

Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val

350

355

360

365

aac act tgg atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc 1153

Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr

370

375

380

acc ctt tcc tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag 1201

Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln

385

390

395

caa gat aaa tta aaa cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca 1249

Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro

400

405

410

32/41

atg ttg cat gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc 1297
Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala
415 420 425

aaa gaa ggc gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att 1345
Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile
430 435 440 445

ggc gtg aag acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag 1393
Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu
450 455 460

aga aag ggt atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt 1441
Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly
465 470 475

gga aaa gga ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac ggc 1489
Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly
480 485 490

ctg gag tcc ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc 1537
Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala
495 500 505

agc acc agt gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca 1585

33/41

Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr

510 515 520 525

ttg tca ttc agt gtc ttt gag att atc ctc ata act tct ctg att ggt 1633

Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly

530 535 540

gga ggc ctt ctt att ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc aaa 1681

Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys

545 550 555

aaa ccc aac aaa ttg act cat ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac cct 1729

Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro

560 565 570

gct gaa agt agt ata gcc aca tgg cat gga gat gat ttc aag gat aag 1777

Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys

575 580 585

cta aac ctg aag gag tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg atc 1825

Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile

590 595 600 605

tta aaa cca tgt tcc acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag ttg 1873

Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu

610 615 620

34/41

gtg gtg aac ttt ggg aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa gcc 1921
Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala
625 630 635

aga acg ggt cag gaa aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg act aga 1969
Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg
640 645 650

att ctg tct tcc tgc cca act tca ata taagtgtgga ctaaaatgcg 2016
Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile
655 660

agaaagggtgt cctgtggtct atgcaaatta gaaaggacat gcagagtttt ccaactagga 2076

agactgaatc tgtggcccca agagaacccat ctccgaagac tgg 2119

<210> 17

<211> 662

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp

1

5

10

15

35/41

Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala

20

25

30

Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg

35

40

45

Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr

50

55

60

Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn

65

70

75

80

Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe

85

90

95

Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu

100

105

110

Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg

115

120

125

Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys

130

135

140

Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro

36/41

145 150 155 160

Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg

165 170 175

Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg

180 185 190

Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr

195 200 205

Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp

210 215 220

Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro

225 230 235 240

Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly

245 250 255

Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val

260 265 270

Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn

275 280 285

37/41

Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu

290

295

300

His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser

305

310

315

320

Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu

325

330

335

Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp

340

345

350

Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp

355

360

365

Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser

370

375

380

Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys

385

390

395

400

Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His

405

410

415

Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly

420

425

430

38/41

Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys

435

440

445

Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly

450

455

460

Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly

465

470

475

480

Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser

485

490

495

Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser

500

505

510

Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe

515

520

525

Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu

530

535

540

Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn

545

550

555

560

Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser

39/41

565

570

575

Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu

580

585

590

Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro

595

600

605

Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn

610

615

620

Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr Gly

625

630

635

640

Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg Ile Leu Ser

645

650

655

Ser Cys Pro Thr Ser Ile

660

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40/41

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 18

CCCCTGATAC ATGAAGCTCT CTCCCAGCC

30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 19

CCAGTCCTCG GAGATGGTTC TCTTGGGGCC

30

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

41/41

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 20

CTGTGTAAGT ACCAATTGTT CCCAGGC

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03556

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10, C07K14/715, C07K16/28,
C12P21/02, G01N33/53, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10, C07K14/715, C07K16/28,
C12P21/02, G01N33/53, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	Gregory G. Mahairas et al., "Sequence-tagged connectors: A sequence approach to mapping and scanning the human genome", Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., (1999), Vol.96, pp.9739-9744	1-10
A	Kishimoto T. et al., "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130" Cell, (1990), Vol.63, pp.1149-1157	1-10
A	WO, 97/12037, A1 (AMRAD OPERATIONS PTY.LTD.), 03 April, 1997 (03.04.97) & AU, 9669805, A & JP, 11-514224, A	1-10
A	WO, 97/15663, A1 (AMRAD OPERATIONS PTY.LTD.), 01 May, 1997 (01.05.97) & AU, 9672668, A & EP, 907730, A1 & JP, 11-514873, A	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 August, 2000 (29.08.00)

Date of mailing of the international search report
05 September, 2000 (05.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl¹ C12N15/12, C12N5/10, C07K14/715, C07K16/28,
 C12P21/02, G01N33/53, G01N33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl¹ C12N15/12, C12N5/10, C07K14/715, C07K16/28,
 C12P21/02, G01N33/53, G01N33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 MEDLINE (STN)、Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	Gregory G. Mahairas et al. "Sequence-tagged connectors: A sequence approach to mapping and scanning the human genome" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (1999), Vol. 96, P. 9739-9744	1-10
A	Kishimoto T. et al. "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transdu- cer, gp130" Cell, (1990), Vol. 63, P. 1149-1157	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.08.00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

甲斐 順子

印

4N 9641

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/12037, A1 (AMRAD OPERATIONS PTY. LTD.) 03. 4月. 1997 (03. 04. 97), &AU, 9669805, A, &JP, 11-514224, A	1-10
A	WO, 97/15663, A1 (AMRAD OPERATIONS PTY. LTD.) 01. 5月. 1997 (01. 05. 97), &AU, 9672668, A, &EP, 907730, A1, &JP, 11-514873, A	1-10

DESCRIPTION

NOVEL HEMOPOIETIN RECEPTOR PROTEIN, NR10

5 Technical Field

The present invention relates to novel hemopoietin receptor proteins, and genes encoding them, as well as methods for producing and using the same.

10 Background Art

A large number of cytokines are known as humoral factors that are involved in the proliferation/differentiation of various cells and the activation of functions of differentiated mature cells as well as cell death. There are specific receptors for these cytokines, which are categorized into several families based on their structural similarities (Hilton D.J., in "Guidebook to Cytokines and Their Receptors" edited by Nicola N.A. (A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press), p8-16 (1994)).

On the other hand, as compared to the similarities of their receptors, the homology of the primary-structure among cytokines is quite low. No significant amino acid homology has been observed, even among cytokine members that belong to the same receptor family. This explains the functional specificity of respective cytokines, as well as the similarities among cellular reactions induced by each cytokine.

Representative examples of the above-mentioned receptor families are the tyrosine kinase receptor family, the hemopoietin receptor family, the tumor necrosis factor (TNF) receptor family, and the transforming growth factor β (TGF β) receptor family. Different signal transduction pathways have been reported to be involved in each of these families. Among these receptor families, many receptors of the hemopoietin receptor family in particular are expressed in blood cells or immunocytes, and their ligands, cytokines, are often termed as hemopoietic factors or interleukins. Some of these hemopoietic factors or interleukins exist within blood and are thought to be involved in systemic humoral regulation of hemopoietic or immune functions.

This contrasts with the belief that cytokines belonging to other families are often involved in only topical regulations. Some of these hemopoietins can be taken as hormone-like factors, and representative peptide hormones, such as the growth hormone, prolactin, or leptin
5 receptors, also belong to the hemopoietin receptor family. Because of these hormone-like systemic regulatory features, it is anticipated that administration of these hemopoietins can be applied to the treatment of various diseases.

Among the large number of cytokines, those that are presently
10 being clinically applied include erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, and IL-2. Combined with IL-11, LIF, and IL-12 that are currently under consideration for clinical trials, and the above-mentioned peptide hormones, such as growth hormone and prolactin, it can be envisaged that by searching novel cytokines that bind to hemopoietin receptors
15 among the above-mentioned various receptor families, it is possible to find a cytokine that can be clinically applied with a higher efficiency.

As mentioned above, cytokine receptors share structural similarities among the family members. Using these similarities, many
20 investigations are aimed at finding novel receptors. In particular, many receptors of the tyrosine kinase receptor family have already been cloned, using its highly conserved sequence at the catalytic site (Matthews W. et al., Cell, 65 (7): p1143-52 (1991)). In comparison, hemopoietin receptors do not have a tyrosine kinase-like enzyme
25 activity domain in their cytoplasmic regions, and their signal transductions are known to be mediated through associations with other tyrosine kinase proteins existing freely in the cytoplasm.

Though the sites on receptors binding with these cytoplasmic tyrosine kinases (JAK kinases) are conserved among family members,
30 the homology is not very high (Murakami M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 11349-11353 (1991)). Actually, the sequence that best characterizes these hemopoietin receptors exists in the extracellular region. In particular, a five amino acid motif, Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (wherein "Xaa" is an arbitrary amino acid), is conserved in almost
35 all of the hemopoietin receptors. Therefore, novel receptors may be obtained by searching for novel family members using this sequence.

In fact, these approaches have already led to the identification of the IL-11 receptor (Robb, L. et al., J. Biol. Chem., 271 (23): 13754-13761 (1996)), the leptin receptor (Gainsford T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (25): p14564-8 (1996)), and the IL-13 receptor (Hilton D.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (1): p497-501 (1996)).

Disclosure of the Invention

The present invention provides novel hemopoietin receptor proteins, and DNA encoding these proteins. The present invention also provides a vector into which the DNA has been inserted, a transformant harboring the DNA, and a method for producing recombinant proteins using the transformant. The present invention also provides methods of screening for compounds that bind to the protein.

Initially, the inventors attempted to find a novel receptor using oligonucleotides encoding the Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser motif (WS motif) as the probe by plaque hybridization, RT-PCR method, and so on. However, it was extremely difficult to strictly select only those to which all 15 nucleotides that encode the motif would completely hybridize under the usual hybridization conditions, because the oligonucleotide tggag(t/c)nnntggag(t/c) (wherein "n" is an arbitrary nucleotide) encoding the motif was short, having just 15 nucleotides, and had a high g/c content. Additionally, similar sequences are contained within cDNA encoding proteins other than hemopoietin receptors, starting with various collagens that are thought to be widely distributed and also have high expression amounts, which makes the screening by the above-mentioned plaque hybridization and RT-PCR extremely inefficient.

To solve these problems, the inventors searched for additional motifs, other than the site of the above-mentioned WS motif, that are conserved in the hemopoietin receptor family. As a result, a residue, either tyrosine or histidine, located 13 to 27 amino acids upstream of the WS motif in the extracellular domain was found to be highly conserved in the receptor family. Furthermore, additional search for consensus sequences that are frequently found in the 6 amino acids from the above Tyr/His toward the C-terminus led to the

identification of the following consensus sequence:
(Tyr/His)-Xaa-(Hydrophobic/Ala)-(Gln/Arg)-Hydrophobic-Arg
(hereinafter, abbreviated as the YR motif). However, this YR motif
is not exactly a perfect consensus sequence, and the combination of
5 the nucleotide sequence that encodes the motif is very complicated.
Therefore, it is practically impossible to synthesize and provide
oligonucleotides that encode all of the amino acid sequences as probes
for hybridization, which is a practical method for screening, or as
primers aimed for RT-PCR.

10 Accordingly, the inventors looked for other approaches to
practically search for novel members of the hemopoietin receptor family
using the above two motifs as probes, and determined that it would
be appropriate to perform a database search on the computer using
partial amino acid sequences of known hemopoietin receptors, including
15 both motifs as the query. The inventors repeated TBlastN searches
on the gss and htgs database in GenBank, using partial amino acid
sequences from multiple known hemopoietin receptors as the query.
As a result, many false positive clones were obtained in all cases.
However, by then comparing the amino acid sequence deduced from the
20 nucleotide sequence proximal to the probe of the above clones with
the sequence of known hemopoietin receptors, the inventors were able
to select genes that encode members of the receptor family. From these
results, the inventors identified a single clone containing a human
genomic sequence which was suspected to encode a novel hemopoietin
25 receptor and named it NR10.

The above nucleotide sequence was used to design specific
oligonucleotide primers. The primers were used to perform 5'- and
3'-RACE using cDNA libraries from human fetal hepatocytes and human
placenta as the template. As a result, a full-length cDNA, NR10.1,
30 encoding a transmembrane receptor of 652 amino acids was isolated,
and the whole nucleotide sequence was determined. At the same time,
a cDNA clone, NR10.2, presumed to be a splice variant of NR10, was
also successfully isolated from the 3'-RACE product. Based on the
determined nucleotide sequence, NR10.2 was suggested to encode a
35 soluble receptor-like protein of 252 amino acids. It was revealed
that the cysteine residues, proline-rich motif, and WSXWS motif in

the extracellular domain that is conserved among the receptor family members, the box1 motif in the intracellular domain that is implicated in signal transduction, and so on were well conserved in the primary structure of NR10.1. Therefore, NR10.1 was considered to encode a
5 typical hemopoietin receptor.

Subsequently, RT-PCR was performed using mRNA prepared from various human organs and primer sets specific to NR10.1 and NR10.2, respectively, to search for tissues expressing the respective genes and to examine their distribution and expression pattern in human
10 tissues. The products of RT-PCR were subjected to Southern blotting using cDNA fragments specific to NR10.1 and NR10.2, respectively, in order to discard the possibility of non-specific amplification and to quantify the amount of the products. The results indicated that the NR10.2 gene is constitutively expressed in all tissues examined
15 at a constant level. In contrast, the expression of NR10.1 was detected in restricted organs and tissues: in particular, strong expression was detected in adult heart, placenta, testis, thymus, and peripheral leukocytes, and weak expression was detected in spleen, bone marrow, prostate, ovary, pancreas, and lung.

The inventors also performed PCR cloning to isolate the
20 full-length open reading frame (ORF) of NR10.1, and by chance, isolated another cDNA clone, dubbed NR10.3, containing a nucleotide sequence in which a single nucleotide is missing from the sequence of NR10.1 and encoding a transmembrane type receptor protein of 662 amino acids. NR10.3 was considered to possess similar functions as NR10.1 from
25 the closely related structures.

Based on the above features, NR10 is presumed to be a novel hemopoietin receptor molecule related to the regulation of the immune system or hematopoiesis *in vivo*. The gene encoding NR10 will be
30 extremely useful in screening for novel hematopoietic factors that can functionally bind to the receptor protein.

Consequently, this invention relates to novel hemopoietin receptors and genes encoding the receptors, as well as a method for producing and using the same. More specifically, the present invention
35 provides the following:

- (1) a DNA selected from the group consisting of:

(a) a DNA encoding a protein consisting of the amino acid sequence of any of SEQ ID NOs: 2, 4, and 17;

(b) a DNA comprising the coding region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs: 1, 3, and 16;

5 (c) a DNA encoding a protein consisting of the amino acid sequence of any of SEQ ID NOs: 2, 4, and 17, in which one or more amino acids are modified by deletion, addition and/or substitution by another amino acid, wherein said protein is functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence of any of SEQ ID NOs:
10 2, 4, and 17; and

(d) a DNA hybridizing under stringent conditions with a DNA consisting of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs: 1, 3, and 16, and encoding a protein that is functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence of any of SEQ ID
15 NOs: 2, 4, and 17;

(2) a DNA encoding a partial peptide of a protein consisting of the amino acid sequence of any of SEQ ID NOs: 2, 4, and 17;

(3) a vector into which the DNA described in (1) or (2) is inserted;

(4) a transformant harboring the DNA described in (1) or (2) in an
20 expressible manner;

(5) a protein or peptide that is encoded by the DNA described in (1) or (2);

(6) a method for producing the protein or peptide of (5), comprising the steps of: culturing the transformant of (4), and recovering the
25 expressed protein from said transformant or the culture supernatant;

(7) a method of screening for a compound that binds to the protein of (5), comprising the steps of:

(a) contacting a sample with the protein of (5) or partial peptide thereof;

30 (b) detecting the binding activity of the sample with the protein of (5) or partial peptide thereof; and

(c) selecting the compound that binds to the protein of (5) or partial peptide thereof;

(8) an antibody binding to the protein of (5);

35 (9) a method for detecting or measuring the protein of (5), comprising the steps of: exposing the antibody of (8) to a sample expected to

contain the protein of (5), and detecting or measuring the production of the immune complex between said antibody and said protein; and (10) a polynucleotide complementary to either a DNA that comprises the nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs: 1, 3, and 16 or its
5 complementary strand, wherein the polynucleotide comprises at least 15 nucleotides .

This invention provides a novel hemopoietin receptor NR10. According to the result of the database search on GenBank, 5'- and 3'-RACE analysis, the inventors finally succeeded in the
10 identification and isolation of a novel hemopoietin receptor gene NR10. It was found that at least two splice variants are transcribed from NR10. One of these variants, the cDNA clone NR10.1, encodes a transmembrane receptor protein, and the other, NR10.2, encodes a soluble receptor-like protein of 252 amino acids. Furthermore, the
15 inventors performed PCR cloning in order to isolate the full length ORF of the NR10.1 cDNA, and by chance, succeeded in isolating another cDNA clone, named NR10.3, containing a full length ORF encoding a transmembrane type receptor protein of 662 amino acids.

The nucleotide sequence of the NR10.1 cDNA and the amino acid
20 sequence of the protein encoded by the cDNA are shown in SEQ ID NOs: 1 and 2, respectively. The nucleotide sequence of the NR10.2 cDNA and the amino acid sequence of the protein encoded by the cDNA are shown in SEQ ID NOs: 3 and 4, respectively. The nucleotide sequence of the NR10.3 cDNA and the amino acid sequence of a protein encoded
25 by the cDNA are shown in SEQ ID NOs: 16 and 17, respectively.

The NR10.3 cDNA clone has a single nucleotide deletion in the adenine cluster, located proximally to the stop codon, as compared with the NR10.1 clone, which results in a frame shift from that position leading to a different open reading frame. Thus, the difference between
30 the two clones is not caused because they are transcription products of splice variants. Except for the deletion of one nucleotide, NR10.1 and NR10.3 cDNA clones share an identical sequence. Meanwhile, their extracellular domains are encoded by a completely identical sequence and, thus, have an identical tertiary structure, and thereby, are
35 considered to recognize the same specific ligand. Furthermore, their intracellular domains share the Box1 motif (Pro-Xaa-Pro sequence

following several basic residues and multiple hydrophobic residues) located immediately after the transmembrane domain, and are presumed to bind to the JAK kinase. Therefore, it is predicted that the proteins encoded by the two clones are functionally equivalent.

5 RT-PCR analysis using mRNA from various human organs revealed that the NR10.2 gene is constitutively expressed in all examined tissues at a constant level. In contrast, expression of the NR10.1 gene was detected in restricted tissues and organs: in particular, strong expression in adult heart, placenta, testis, thymus, and peripheral
10 leukocytes, and weak expression in spleen, bone marrow, prostate, ovary, pancreas, and lung. Thus, it was presumed that NR10.1 encodes a novel hematopoietic factor receptor.

 The above NR10 proteins may be useful for medical application. Since NR10.1 is expressed in thymus, peripheral leukocytes, and spleen,
15 it could be a receptor for an unknown hematopoietic factor. Therefore, NR10 proteins are a useful tool in the identification of the unknown hematopoietic factor. They may also be used to screen a peptide library or synthetic chemical compounds in order to isolate or identify agonists or antagonists that can functionally bind to the NR10 molecule.
20 Moreover, clinical application is expected of novel molecules binding to the NR10 molecule and specific antibodies that can limit the function of the NR10 molecule to regulate the immune response or hematopoiesis *in vivo*, by searching such molecules and antibodies.

 NR10 is expected to be expressed in a restricted population of
25 cells in the hematopoietic tissues, and thus, anti-NR10 antibodies are useful for the isolation of such cell populations. The isolated cell populations may be used in cell transplantation. Furthermore, it is expected that the anti-NR10 antibody may be used for the diagnosis or treatment of diseases, such as leukemia.

30 On the other hand, the soluble proteins comprising the extracellular domain of NR10 protein and the splice variant of NR10, NR10.2, may be used as a decoy-type receptor to inhibit the NR10 ligand. They may be useful for treatment of diseases in which NR10 is implicated, such as leukemia.

35 This invention includes proteins that are functionally equivalent to the NR10 protein. For instance, homologues of human

NR10 protein in other species and mutants of human NR10 protein are included. Herein, the term "functionally equivalent" refers to proteins having an equivalent biological activity as compared to that of an NR10 protein. Such biological activity may include the protein activity as a membrane bound or soluble form hematopoietic factor receptor.

Methods of introducing mutations for preparing proteins that are functionally equivalent to another protein are well known to one skilled in the art. For example, one may use site-directed mutagenesis (Hashimoto-Goto, T. et al. Gene 152: 271-275 (1995); Zoller, M.J., and Smith M. Methods Enzymol. 100: 468-500 (1983); Kramer, W. et al. Nucleic Acids Res. 12: 9441-9456 (1984); Kramer W, and Fritz HJ Methods. Enzymol. 154: 350-367 (1987); Kunkel, TA Proc Natl Acad Sci U S A. 82: 488-492 (1985); Kunkel Methods Enzymol. 85: 2763-2766 (1988)) and such in order to introduce an appropriate mutation into the amino acid sequence of human NR10 protein and prepare a protein that is functionally equivalent to the protein. Mutations of amino acids may occur in nature as well. This invention includes proteins having the amino acid sequence of human NR10 protein in which one or more amino acid residues are mutated, and wherein the proteins are functionally equivalent to human NR10 protein.

As a protein functionally equivalent to the NR10 protein of the invention, the following can be specifically mentioned: one in which one or two or more, preferably, two to 30, more preferably, two to ten amino acids are deleted in any one of the amino acid sequences of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 17; one in which one or two or more, preferably, two to 30, more preferably, two to ten amino acids have been added into any one of the amino acid sequences of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 17; or one in which one or two or more, preferably, two to 30, more preferably, two to ten amino acids have been substituted with other amino acids in any one of the amino acid sequences of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 17.

As for the amino acid residue to be mutated, it is preferable that it be mutated into a different amino acid that allows the properties of the amino acid side-chain are conserved. Examples of properties of amino acid side chains are the following: hydrophobic amino acids

(A, I, L, M, F, P, W, Y, V), hydrophilic amino acids (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), and amino acids comprising the following side chains: an aliphatic side-chain (G, A, V, L, I, P); a hydroxyl group containing side-chain (S, T, Y); a sulfur atom containing side-chain (C, M); a carboxylic acid and amide containing side-chain (D, N, E, Q); a base-containing side-chain (R, K, H); and an aromatic-containing side-chain (H, F, Y, W) (The parenthetical letters indicate the one-letter codes of amino acids).

It is known that a protein may have an amino acid sequence of which is modified by deletion, addition, and/or substitution by other amino acids of one or more amino acid residues, yet still retain its biological activity (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-5666 (1984); Zoller, M. J. & Smith, M., Nucleic Acids Research 10: 6487-6500 (1982); Wang, A. et al., Science 224: 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-6413 (1982)).

A fusion protein containing human NR10 protein is an example of a protein in which one or more amino acid residues have been added to the amino acid sequence (SEQ ID NO: 2, 4 or 17) of human NR10 protein. A fusion protein is made by fusing the human NR10 protein of the present invention with another peptide(s) or protein(s) and is included in the present invention. A fusion protein can be prepared by ligating a DNA encoding the human NR10 protein of the present invention with a DNA encoding another peptide(s) or protein(s) in frame, introducing the ligated DNA into an expression vector, and expressing the fusion gene in a host. Methods known by one skilled in the art can be used for preparing such a fusion gene. There is no restriction as to the other peptide(s) or protein(s) that is (are) fused to the protein of this invention.

Other peptide(s) to be fused with a protein of the present invention are known peptides, for example, FLAG (Hopp, T.P. et al., Biotechnology 6: 1204-1210 (1988)), 6xHis constituting six histidine (His) residues, 10x His, Influenza agglutinin (HA), human c-myc fragment, VSV-GP fragment, p18HIV fragment, T7-tag, HSV-tag, E-tag, SV40T antigen fragment, lck tag, α -tubulin fragment, B-tag, Protein C fragment, and so on. Other examples of peptides to be fused with

the protein of the present invention are the glutathione-S-transferase (GST), Influenza agglutinin (HA), immunoglobulin constant region, β -galactosidase, maltose-binding protein (MBP), etc.

Fusion proteins can be prepared by fusing commercially available
5 DNA encoding these peptides or proteins with DNA encoding a protein of the present invention and expressing the fused DNA prepared.

The hybridization technique (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, (1989)) is well known to one skilled in the art as an alternative method for
10 preparing a protein functionally equivalent to a certain protein. More specifically, one skilled in the art can utilize the general procedure to obtain a protein functionally equivalent to a human NR10 protein by isolating DNA having a high homology with the whole or part of the DNA (SEQ ID NO: 1, 3 or 16) encoding the human NR10 protein.
15 Thus, the present invention includes such proteins, that are encoded by DNAs that hybridize with a DNA consisting of a DNA encoding human NR10 protein or part thereof and that are functionally equivalent to a human NR10 protein. For instance, homologues of human NR10 in other mammals (such as those of monkey, mouse, rabbit, and bovine)
20 are included. In order to isolate a cDNA with high homology to a DNA encoding a human NR10 protein from animals, it is preferable to use tissues such as heart, placenta, and testis.

Stringent hybridization conditions for isolating DNA encoding functionally equivalent proteins of human NR10 protein can be suitably
25 selected by one skilled in the art, and for example, low-stringent conditions can be given. Low-stringent conditions are, for example, 42°C, 2x SSC, and 0.1% SDS, and preferably, 50°C, 2x SSC, and 0.1% SDS. Highly stringent conditions are more preferable and include, for example, 65°C, 2x SSC, and 0.1% SDS. Under these conditions, the
30 higher the temperature, the higher the homology of the obtained DNA will be. However, several factors other than temperature, such as salt concentration, can influence the stringency of hybridization and one skilled in the art can suitably select the factors to accomplish a similar stringency.

35 In place of hybridization, the gene amplification method, for example, the polymerase chain reaction (PCR) method can be utilized

to isolate the object DNA using primers synthesized based on the sequence information of the DNA encoding the human NR10 protein (SEQ ID NO: 1, 3 and 16).

Proteins that are functionally equivalent to human NR10 protein, encoded by DNA isolated through the above hybridization technique or by the gene amplification technique, normally have a high homology to the amino acid sequence of the human NR10 protein. The proteins of the present invention also include proteins that are functionally equivalent to the human NR10 protein, which also have a high homology with the protein comprising any one of the amino acid sequences of SEQ ID NO: 2, 4, or 17. High homology is defined normally as a homology of 70% or higher, favorably 80% or higher, more favorably 90% or higher, and most favorably 95% or higher. The homology of a protein can be determined by the algorithm in "Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 726-730 (1983)."

The amino acid sequence, molecular weight, isoelectric point, the presence or absence of the sugar chain, and the form of a protein of the present invention may differ according to the producing cells, host, or purification method described below. However, so long as the obtained protein has an equivalent function to a protein of the present invention (SEQ ID NO: 2, 4 and 17), it is included in the present invention. For example, if a protein of the present invention is expressed in prokaryotic cells, such as *E. coli*, a methionine residue is added at the N-terminus of the amino acid sequence of the expressed protein. If a protein of the present invention is expressed in eukaryotic cells, such as mammalian cells, the N-terminal signal sequence is removed. Such proteins are also included in the proteins of the present invention.

For example, as the result of analysis of the protein of the invention based on the method in "Von Heijne, G., Nucleic Acids Research, 14: 4683-4690 (1986)", it was presumed that the signal sequence is from the 1st Met to the 32nd Ala in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, 4 and 17. Therefore, the present invention encompasses a protein comprising the sequence from the 33rd Ala to 652nd Asp in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Similarly, the present invention encompasses a protein comprising the sequence from the 33rd

Ala to 252nd Val in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4. Similarly, the present invention encompasses a protein comprising the sequence from the 33rd Ala to 662nd Ile in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17.

5 A protein of the present invention can be prepared by methods known to one skilled in the art, as a recombinant protein, and also as a natural protein. A recombinant protein can be prepared by inserting a DNA encoding a protein of the present invention (for example, the DNA comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 3 or 16)
10 into a suitable expression vector, introducing the vector into a suitable host cell, and collecting the protein from the resulting transformant. After obtaining the extract, recombinant protein can be purified and prepared by subjecting to chromatography, such as ion exchange chromatography, reverse phase chromatography, gel
15 filtration, and such, or affinity chromatography, to which antibodies against the protein of the invention are immobilized, or combining one or more of these columns.

 Further, when a protein of the present invention is expressed within host cells (for example, animal cells and *E. coli*), as a fusion
20 protein with glutathione-S-transferase protein or as a recombinant protein supplemented with multiple histidines, the expressed recombinant protein can be purified using a glutathione column or nickel column.

 After purifying the fusion protein, it is also possible to exclude
25 regions other than the objective protein by cutting with thrombin, factor-Xa, and such, as required.

 A natural protein may be isolated by methods known to one skilled in the art. For instance, extracts of tissue or cells expressing a protein of the invention may be reacted with an affinity column described
30 below, to which antibodies binding to the NR10 protein are attached, to isolate the natural protein. Polyclonal or monoclonal antibodies may be used.

 This invention also includes partial peptides of the proteins of the invention. The peptide consisting of the amino acid sequence
35 specific to a protein of the invention are composed of at least 7 amino acids, favorably more than 8 amino acids, and more favorably

more than 9 amino acids. The partial peptides may be useful for preparing antibodies against a protein of the invention, or screening compounds binding to a protein of the present invention, or screening activators or inhibitors of a protein of the present invention.

5 Alternatively, it may be used as an antagonist for the ligand of a protein of the invention. A partial peptide of the present invention is, for example, a partial peptide having the active center of the protein consisting of any one of the amino acid sequences of SEQ ID NO: 2, 4, or 17. Additionally, the partial peptides may contain one

10 or more regions of the hydrophilic regions or hydrophobic regions presumed by hydrophobicity plot analysis. These partial peptides may contain the whole or a part of a hydrophilic region, or may contain the whole or a part of a hydrophobic region. Moreover, for example, soluble proteins and proteins comprising extracellular regions of

15 a protein of the invention are also encompassed in the present invention.

The partial peptides of the invention may be produced by genetic engineering techniques, well-known peptide synthesizing methods, or by excising a protein of the invention with a suitable peptidase. The solid-phase synthesizing method and the liquid-phase synthesizing

20 method may be used as peptide synthesizing methods.

Another objective of this invention is to provide DNA encoding a protein of the invention. The DNA may be useful for producing the above proteins of the invention *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, for example, it is also possible to use the DNA for application to

25 gene therapy and such of diseases arising from abnormalities of the gene encoding the protein of the present invention. The DNA may be provided in any form as long as it encodes a protein of the invention. Thus, the DNA may be a cDNA synthesized from mRNA, genomic DNA, or chemically synthesized DNA. Furthermore, a DNA comprising any

30 nucleotide sequence based on the degeneracy of genetic code may be included as long as it encodes a protein of the present invention.

The DNA of the invention can be prepared by any method known to one skilled in the art. For instance, the DNA may be prepared by constructing a cDNA library from cells expressing the protein, and

35 performing hybridization using a partial sequence of the DNA of the invention (SEQ ID NO: 1 or 3, for instance) as a probe. A cDNA library

may be constructed according to the method described in the literature (Sambrook J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), or a commercial DNA library may be used. Alternatively, the DNA may be prepared by obtaining RNA from a cell expressing a protein of the present invention, synthesizing oligo DNA based on the sequence of the present DNA (SEQ ID NO: 1, 3 or 16, for instance), performing PCR using the synthesized DNA as the primer, and amplifying the cDNA encoding a protein of the present invention.

By determining the nucleotide sequence of the obtained cDNA, the translation region encoded by the cDNA can be determined, and the amino acid sequence of the protein of the present invention can be obtained. Furthermore, genomic DNA can be isolated by screening genomic DNA libraries using the obtained cDNA as a probe.

Specifically, this can be done as follows: First, mRNA is isolated from cells, tissues, and organs (for example, ovary, testis, placenta, etc.) expressing a protein of the invention. To isolate the mRNA, at first, whole RNA is prepared using well-known methods, for example, guanidine ultracentrifugation method (Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry 18: 5294-5299 (1979)), the AGPC method (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. 162: 156-159 (1987)), and such, and mRNA from whole mRNA is purified using the mRNA Purification Kit (Pharmacia), etc. Alternatively, mRNA may be directly prepared using the QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia).

cDNA is synthesized using reverse transcriptase from the obtained mRNA. cDNA can be synthesized by using the AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (SEIKAGAKU CORPORATION), etc. Additionally, cDNA synthesis and amplification may be also done by using the primer and such described herein following the 5'-RACE method (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 8998-9002 (1988); Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17: 2919-2932 (1989)) utilizing the polymerase chain reaction (PCR) and the 5'-Ampli FINDER RACE KIT (Clontech).

The objective DNA fragment is prepared from the obtained PCR product and ligated with the vector DNA. Thus, a recombination vector is created, introduced into *E. coli*, and such, and colonies are selected to prepare the desired recombination vector. The nucleotide sequence

of the objective DNA can be verified by known methods, for example, the dideoxy nucleotide chain termination method.

With regards to the DNA of the invention, a sequence with higher expression efficiency can be designed by considering the codon usage frequency in the host used for the expression (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research 9: r43-74 (1981)). The DNA of the invention may also be modified using commercially available kits and known methods. Modifications are given as, for example, digestion by restriction enzymes, insertion of synthetic oligonucleotides and suitable DNA fragments, addition of linkers, insertion of a start codon (ATG) and/or stop codon (TAA, TGA, or TAG), and such.

Specifically, the DNA of the invention includes DNA consisting of the nucleotide sequence from the 523rd "A" to 2478th "C" of SEQ ID NO: 1, 523rd "A" to 1278th "G" of SEQ ID NO: 3, or 11th "A" to 1996th "A" of SEQ ID NO: 16.

The DNA of the present invention includes DNA that hybridize under stringent conditions to the DNA consisting of any one of the nucleotides, wherein the DNA encodes a protein functionally equivalent to an above-mentioned protein of the present invention.

Stringent conditions can be suitably selected by one skilled in the art, and for example, low-stringent conditions can be given. Low-stringent conditions are, for example, 42°C, 2x SSC, and 0.1% SDS, and preferably 50°C, 2x SSC, and 0.1% SDS. More preferable are highly stringent conditions which are, for example, 65°C, 2x SSC, and 0.1% SDS. Under these conditions, the higher the temperature, the higher the homology of the obtained DNA will be. The above DNA hybridizing to the DNA with the sequences of SEQ ID NO: 1, 3, and 16, is preferably a natural DNA such as cDNA and chromosomal DNA.

Moreover, the present invention provides a vector containing a DNA of the invention as an insert. The vector may be useful for maintaining the DNA in host cells or producing the protein of the invention.

If the host cell is *E. coli* (such as JM109, DH5 α , HB101, and XL1Blue), any vector may be used as long as it contains the "ori" for amplification in *E. coli* that enables large-scale preparation, and a selection marker for transformants (for instance, a drug

resistance gene that enables selection by a drug such as ampicillin, tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol). For instance, series of the M13 vectors and pUC vectors, pBR322, pBluescript, pCR-Script, and so on may be used. For the purpose of subcloning or excision of a cDNA, pGEM-T, pDIRECT, pT7, and such may be used as well. For producing the protein of the invention, an expression vector is especially useful. For instance, if the protein is to be expressed in *E. coli*, the expression vector must have such characteristics as above to be amplified in *E. coli*, and a promoter for efficient expression, such as the lacZ promoter (Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989); FASEB J. 6: 2422-2427 (1992)), araB promoter (Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988), or T7 promoter. Such vector includes pGEX-5X-1 (Pharmacia); vectors in the QIAexpress system (QIAGEN), pEGFP, pET (BL21 expressing the T7 RNA polymerase is favorably used as the host), and so on except those mentioned above.

The vector may contain a signal sequence for polypeptide secretion. The pelB signal sequence (Lei S.P. et al., J. Bacteriol. 169: 4379 (1987)) may be used to produce the proteins in the periplasm of *E. coli*. Vectors may be introduced into host cells, for example, by the calcium chloride method or electroporation.

For example, the expression vector to prepare the protein of the invention may be a mammal-derived expression vector (e.g., pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids Res., 18 (17): p5322 (1990)), pEF and pCDM8), an insect cell-derived expression vector (e.g., "Bac-to-BAC baculovirus expression system" (GIBCO BRL), pBacPAK8), a plant-derived expression vector (e.g., pMH1 and pMH2), an animal virus-derived expression vector (e.g., pHSV, pMV, and pAdexLcw), a retrovirus-derived expression vector (e.g., pZIpneo), an yeast-derived expression vector (e.g., "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11 and SP-Q01), or a *Bacillus subtilis*-derived expression vector (e.g., pPL608 and pKTH50), other than *E. coli*.

For the expression in animal cells, such as CHO, COS, and NIH3T3 cells, the expression vector must have a promoter such as SV40 promoter (Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979)), MMLV-LTR promoter, EF1 α promoter (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990)), and CMV promoter. More favorably, the vector may contain a marker for

the selection of transfected cells (for instance, a drug resistance gene for selection by a drug such as neomycin and G418). Such vectors include pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13, and so on.

Furthermore, in order to achieve stable gene expression and
5 amplification of the copy number of genes in cell, CHO cells deficient in the metabolic pathway for nucleotide synthesis may be used. The CHO cell is transfected with an expression vector containing the DHFR gene that complements the deficiency (such as pCHOI), then the vector may be amplified by methotrexate (MTX) treatment. For transient gene
10 expression, COS cells containing a gene expressing the SV40 T-antigen on its chromosome may be used to transform with a vector containing the SV40 replication origin (such as pCD). Examples of replication origins to be used in the present invention include those derived from polyomavirus, adenovirus, bovine papillomavirus (BPV), and such.
15 Moreover, to amplify the gene copies in host cell lines, the expression vector may include an aminoglycoside transferase (APH) gene, thymidine kinase (TK) gene, *E. coli* xanthine guanine phosphoribosyl transferase (Ecogpt) gene, dihydrofolate reductase (dhfr) gene, and such as a selective marker.

20 *In vivo* expression of the DNA of the invention may be performed by constructing the DNA into an appropriate vector and transfecting the construct into the body using retrovirus, liposome, cationic liposome, adenovirus, and so on. It is possible to use such a construct to perform gene therapy for diseases that arise from mutations in
25 the NR10 gene. Examples of vectors used for this purpose include an adenovirus vector (such as pAdexlcw) and a retrovirus vector (such as pZIPneo), but are not limited thereto. General manipulations, such as insertion of the DNA into the vector, may be performed by using standard methods (Molecular Cloning, 5.61-5.63). The vector may be
30 administered to the patient through *ex vivo* or *in vivo* methods.

Another object of this invention is to provide a transformant that contains the DNA of the invention in a expressible manner. The host cell to insert the vector of the present invention is not limited in any way, and *E. coli*, a variety of animal cells, and so on may
35 be used. The transformant may be used as a producing system for preparing or expressing a protein of the invention. *In vitro* and *in*

vivo production systems are known as production systems for producing proteins. Production systems using eukaryotic cells and prokaryotic cells may be used as the *in vitro* production systems.

When using eukaryotic cells, production systems using, for example, animal cells, plant cells, and fungal cells are available as hosts. Examples animal cells used include mammalian cells such as CHO (J. Exp. Med., 108: 945 (1995)), COS, 3T3, myeloma, baby hamster kidney (BHK), HeLa, Vero, amphibian cells such as *Xenopus* oocytes (Valle, et al., Nature 291: 338-340 (1981)), insect cells such as sf9, sf21, or Tn5. As CHO cells, especially DHFR gene-deficient CHO cell, dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 (1980)), and CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275 (1968)) can be suitably used. For large-scale preparation in animal cells, CHO cells may be favorably used. The vector may be transfected into host cells using a variety of methods, such as those using calcium phosphate, DEAE-dextran, or cationic liposome DOTAP (Boeringer Mannheim), as well as electroporation, lipofection, and so on.

Nicotiana tabacum-derived cells are well known as protein production systems in plant cells, and these can be callus cultured. As fungal cells, yeasts such as the *Saccharomyces* genus, for example, *Saccharomyces cerevisiae*; filamentous bacteria, such as *Aspergillus* genus, for example, *Aspergillus niger* are known.

Bacterial cells may be used as prokaryotic production systems. As bacterial cells, *E. coli*, for example, JM109, DH5 α , HB101, and such, as well as others like *Bacillus subtilis* are known.

Proteins can be obtained by transforming these cells with the objective DNA, and culturing the transformed cells *in vitro* according to known methods. For example, DMEM, MEM, RPMI1640, and IMDM can be used as culture media of animal cells. Occasionally, fetal calf serum (FCS) and such serum supplements may be added in the above media; alternatively, a serum-free culture medium may be used. The pH is preferably from about 6 to 8. The culturing is usually performed at about 30°C to 40°C, for about 15 to 200 hr, and medium changes, aeration, and stirring is done as necessary.

On the other hand, for example, production systems using animals and plants may be given as *in vivo* protein production systems. The

objective DNA is introduced into the plant or animal, and the protein is produced within the plant or animal, and then, the protein is recovered. The term "host" as used in the present invention encompasses such animals and plants as well.

5 When using animals, mammalian and insect production systems can be used. As mammals, goats, pigs, sheep, mice, and bovine may be used (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Transgenic animals may also be used when using mammals.

10 For example, the objective DNA is prepared as a fusion gene with a gene encoding a protein intrinsically produced into milk, such as goat β casein. Next, the DNA fragment containing the fusion gene is injected into goat's embryo, and this embryo is implanted in female goat. The objective protein can be collected from the milk of the transgenic goats produced from the goat that received the embryo,
15 and descendants thereof. To increase the amount of protein-containing milk produced from the transgenic goat, a suitable hormone/hormones may be given to the transgenic goats (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology 12: 699-702 (1994)).

20 Silk worms may be used as insects. When using silk worms, they are infected with baculoviruses to which the DNA encoding objective protein has been inserted, and the desired protein can be obtained from the body fluids of the silk worm (Susumu, M. et al., Nature 315: 592-594 (1985)).

25 When using plants, for example, tobacco can be used. In the case of tobacco, the DNA encoding the objective protein is inserted into a plant expression vector, for example, pMON 530, and this vector is introduced into a bacterium such as *Agrobacterium tumefaciens*. This bacterium is infected to tobacco, for example, *Nicotiana tabacum*, and it is able to obtain the desired polypeptide from the tobacco
30 leaves (Julian, K. -C. Ma et al., Eur. J. Immunol. 24: 131-138 (1994)).

 Thus-obtained protein of the invention is isolated from inside or outside (medium, etc.) the host cell, and may be purified as a substantially pure homogenous protein. The separation and purification of the protein can be done using conventional separation
35 and purification methods used to purify proteins and are not limited to any specific method. For example, chromatography column,

filtration, ultrafiltration, salting out, solvent precipitation, solvent extraction, distillation, immunoprecipitation, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing, dialysis, recrystallization, and such may be suitably selected, or
5 combined to separate/purify the protein.

For example, affinity chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reversed-phase chromatography, adsorption chromatography, and such can be exemplified as chromatographies (Strategies for Protein
10 Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). These chromatographies can be performed by liquid chromatography, such as HPLC, FPLC, and the like. The present invention encompasses proteins highly purified by using such purification methods.

15 Proteins can be arbitrarily modified, or peptides may be partially excised by treating the proteins with appropriate modification enzymes prior to or after the purification. Trypsin, chymotrypsin, lysyl endopeptidase, protein kinase, glucosidase, and such are used as protein modification enzymes.

20 The present invention also provides antibodies binding to the protein of the invention. There is no particular restriction as to the form of the antibody of the present invention and the present invention includes polyclonal antibodies, as well as monoclonal antibodies. The antiserum obtained by immunizing animals such as
25 rabbits with a protein of the present invention, as well polyclonal and monoclonal antibodies of all classes, human antibodies, and humanized antibodies made by genetic engineering, are also included.

A protein of the invention that is used as a sensitizing antigen for obtaining antibodies is not restricted by the animal species from
30 which it is derived, but is preferably a protein derived from mammals, for example, humans, mice, or rats, especially preferably from humans. Proteins of human origin can be obtained by using the nucleotide sequence or amino acid sequence disclosed herein.

Herein, an intact protein or its partial peptide may be used
35 as the antigen for immunization. As partial peptides of the proteins, for example, the amino (N) terminal fragment of the protein, and the

carboxy (C) terminal fragment can be given. "Antibody" as used herein means an antibody that specifically reacts with the full-length or fragments of the protein.

5 A gene encoding a protein of the invention or a fragment thereof is inserted into a well-known expression vector, and by transforming the host cells with the vector described herein, the objective protein or a fragment thereof is obtained from inside or outside the host cell using well-known methods, and this protein can be used as the sensitizing antigen. Also, cells expressing the protein, cell lysates,
10 or chemically synthesized protein of the invention may be also used as a sensitizing antigen.

The mammals that are immunized by the sensitizing antigen are not restricted, but it is preferable to select animals by considering the adaptability with the parent cells used in cell fusion. Generally,
15 animals belonging to the rodentia, lagomorpha, and Primate family are used.

Examples of animals belonging to rodentia that may be used include mice, rats, hamsters, and such. Examples of animals belonging to lagomorpha that may be used include, for example, rabbits. Examples
20 of Primates that may be used include monkeys. Examples of monkeys to be used include the infraorder catarrhini (Old World Monkeys), for example, cynomolgus monkeys, rhesus monkeys, sacred baboons, chimpanzees, and such.

Well-known methods may be used to immunize animals with the
25 sensitizing antigen. For example, the sensitizing antigen is generally injected intraperitoneally or subcutaneously into mammals. Specifically, the sensitizing antigen is suitably diluted and suspended in physiological saline or phosphate-buffered saline (PBS) and mixed with a suitable amount of general adjuvant if desired, for
30 example, with Freund's complete adjuvant. Then, the solution is emulsified and injected into the mammal. Thereafter, the sensitizing antigen suitably mixed with Freund's incomplete adjuvant is preferably given several times every 4 to 21 days. A suitable carrier can also
35 be used when immunizing an animal with the sensitizing antigen. After the immunization, the elevation in the level of serum antibody is detected by usual methods.

Polyclonal antibodies against a protein of the invention can be obtained as follows. After verifying that a desired serum antibody level has been reached, blood is withdrawn from the mammal sensitized with the antigen. Serum is isolated from this blood using well-known methods. The serum containing the polyclonal antibody may be used as the polyclonal antibody, or according to needs, the polyclonal antibody-containing fraction may be further isolated from the serum. For instance, a fraction of antibodies that specifically recognize the protein of the invention may be prepared by using an affinity column to which the protein is coupled. Then, the fraction may be further purified by using a Protein A or Protein G column in order to prepare immunoglobulin G or immunoglobulin M.

To obtain monoclonal antibodies, after verifying that the desired serum antibody level has been reached in the mammal sensitized with the above-described antigen, immunocytes are taken from the mammal and used for cell fusion. For this purpose, splenocytes can be mentioned as preferable immunocytes. As parent cells fused with the above immunocytes, mammalian myeloma cells are preferably used. More preferably, myeloma cells that have acquired the feature, which can be used to distinguish fusion cells by agents, are used as the parent cell.

The cell fusion between the above immunocytes and myeloma cells can be conducted according to known methods, for example, the method of Milstein et al. (Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. 73: 3-46 (1981)).

The hybridoma obtained from cell fusion is selected by culturing the cells in a standard selective culture medium, for example, HAT culture medium (hypoxanthine, aminopterin, thymidine-containing culture medium). The culture in this HAT medium is continued for a period sufficient enough for cells (non-fusion cells) other than the objective hybridoma to perish, usually from a few days to a few weeks. Next, the usual limiting dilution method is carried out, and the hybridoma producing the objective antibody is screened and cloned.

Other than the above method for obtaining hybridomas, by immunizing an animal other than humans with the antigen, a hybridoma producing the objective human antibodies having the activity to bind

to proteins can be obtained by the method of sensitizing human lymphocytes, for example, human lymphocytes infected with the EB virus, with proteins, protein-expressing cells, or lysates thereof *in vitro*, fusing the sensitized lymphocytes with myeloma cells derived from
5 human, for example U266, having a permanent cell division ability (Unexamined Published Japanese Patent Application (JP-A) No. Sho 63-17688).

The obtained monoclonal antibodies can be purified by, for example, ammonium sulfate precipitation, protein A or protein G column,
10 DEAE ion exchange chromatography, an affinity column to which the protein of the present invention is coupled, and so on. The antibody may be useful for the purification or detection of a protein of the invention. It may also be a candidate for an agonist or antagonist of the protein. Furthermore, it is possible to use it for the antibody
15 treatment of diseases in which the protein is implicated. For *in vivo* administration (in such antibody treatment), human antibodies or humanized antibodies may be favorably used because of their reduced antigenicity.

For example, a human antibody against a protein can be obtained
20 using hybridomas made by fusing myeloma cells with antibody-producing cells obtained by immunizing a transgenic animal comprising a repertoire of human antibody genes with an antigen such as a protein, protein-expressing cells, or a cell lysate thereof (WO92/03918, WO93/2227, WO94/02602, WO94/25585, WO96/33735, and WO96/34096).

25 Other than producing antibodies by using hybridoma, antibody-producing immunocytes, such as sensitized lymphocytes that are immortalized by oncogenes, may also be used.

Such monoclonal antibodies can also be obtained as recombinant antibodies produced by using the genetic engineering technique (for
30 example, Borrebaeck, C.A.K. and Larrick, J.W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, (1990)). Recombinant antibodies are produced by cloning the encoding DNA from immunocytes, such as hybridoma or antibody-producing sensitized lymphocytes, incorporating this into a suitable vector,
35 and introducing this vector into a host to produce the antibody. The present invention encompasses such recombinant antibodies as well.

Moreover, the antibody of the present invention may be an antibody fragment or a modified-antibody, so long as it binds to a protein of the invention. For example, Fab, F (ab')₂, Fv, or single chain Fv in which the H chain Fv and the L chain Fv are suitably linked by a linker (scFv, Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883 (1988)) can be given as antibody fragments. Specifically, antibody fragments are produced by treating antibodies with enzymes, for example, papain, pepsin, and such, or by constructing a gene encoding an antibody fragment, introducing this into an expression vector, and expressing this vector in suitable host cells (for example, Co, M.S. et al., J. Immunol. 152: 2968-2976 (1994); Better, M. and Horwitz, A.H., Methods Enzymol. 178: 476-496 (1989); Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol., 178: 497-515 (1989); Lamoyi, E., Methods Enzymol. 121: 652-663 (1986); Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. 121: 663-669 (1986); Bird, R.E. and Walker, B.W., Trends Biotechnol. 9: 132-137 (1991)).

As modified antibodies, antibodies bound to various molecules such as polyethylene glycol (PEG) can be used. The antibody of the present invention encompasses such modified antibodies as well. To obtain such a modified antibody, chemical modifications are done to the obtained antibody. These methods are already established in the field.

The antibody of the invention may be obtained as a chimeric antibody, comprising non-human antibody-derived variable region and human antibody-derived constant region, or as a humanized antibody comprising non-human antibody-derived complementarity determining region (CDR), human antibody-derived framework region (FR), and human antibody-derived constant region by using conventional methods.

Antibodies thus obtained can be purified to uniformity. The separation and purification methods used in the present invention for separating and purifying the antibody may be any method usually used for proteins. For instance, column chromatography, such as affinity chromatography, filter, ultrafiltration, salt precipitation, dialysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric point electrophoresis, and so on, may be appropriately selected and combined to isolate and purify the antibodies (Antibodies:

a laboratory manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), but is not limited thereto. Antibody concentration of the above mentioned antibody can be assayed by measuring the absorbance, or by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), etc.

Protein A or Protein G column can be used for the affinity chromatography. Protein A column may be, for example, Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia), and so on.

Other chromatography may also be used, such as ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reverse phase chromatography, and adsorption chromatography (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. by Marshak D.R. et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). These may be performed on liquid chromatography such as HPLC or FPLC.

Examples of methods that assay the antigen-binding activity of the antibodies of the invention include, for example, measurement of absorbance, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), enzyme immunoassay (EIA), radio immunoassay (RIA), or fluorescent antibody method. For example, when using ELISA, a protein of the invention is added to a plate coated with the antibodies of the invention, and next, the objective antibody sample, for example, culture supernatants of antibody-producing cells, or purified antibodies are added. Then, secondary antibody recognizing the antibody, which is labeled by alkaline phosphatase and such enzymes, is added, the plate is incubated and washed, and the absorbance is measured to evaluate the antigen-binding activity after adding an enzyme substrate such as p-nitrophenyl phosphate. As the protein, a protein fragment, for example, a fragment comprising a C-terminus, or a fragment comprising an N-terminus may be used. To evaluate the activity of the antibody of the invention, BIAcore (Pharmacia) may be used.

By using these methods, the antibody of the invention and a sample presumed to contain a protein of the invention are contacted, and the protein of the invention is detected or assayed by detecting or assaying the immune complex of the above-mentioned antibody and protein.

A method of detecting or assaying a protein of the invention

is useful in various experiments using proteins as it can specifically detect or assay the proteins.

Another object of this invention is to provide a polynucleotide of at least 15 nucleotides that is complimentary to the DNA encoding
5 human NR10 protein (SEQ ID NO: 1, 3, or 16) or its complimentary strand.

Herein, the term "complimentary strand" is defined as one strand of a double strand DNA composed of A:T and G:C base pairs to the other strand. Also, "complimentary" is defined as not only those completely matching within a continuous region of at least 15 nucleotides, but
10 also having a homology of at least 70%, favorably 80% or higher, more favorably 90% or higher, and most favorably 95% or higher within that region. The homology may be determined using the algorithm described herein.

Probes or primers for detection or amplification of the DNA
15 encoding a protein of the invention, or a nucleotide or nucleotide derivative for the suppression of the protein expression (such as antisense oligonucleotide and ribozyme) are included in these polynucleotides. Such polynucleotides may be also used for preparing DNA chips.

20 The antisense oligonucleotide that hybridizes with a portion of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, 3, and 16 is also included in the antisense oligonucleotides of the present invention. This antisense oligonucleotide is preferably one against at least 15 continuous nucleotides in any one of the nucleotide sequences of
25 SEQ ID NO: 1, 3 and 16. More preferably, it is the antisense oligonucleotide against at least 15 continuous nucleotides containing a translation start codon.

Derivatives or modified products of antisense oligonucleotides can be used as antisense oligonucleotides. Examples of such modified
30 products include, for example, lower alkyl phosphonate modifications such as methyl-phosphonate-type or ethyl-phosphonate-type; phosphorothioate; phosphoroamidate-modified products, and such.

The term "antisense oligonucleotide(s)" as used herein means, not only those in which the nucleotides corresponding to those
35 constituting a specified region of a DNA or mRNA are entirely complementary, but also those having a mismatch of one or more

nucleotides, so long as the DNA or mRNA and the oligonucleotide can selectively and stably hybridize with the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 3 or 16.

5 The antisense oligonucleotide derivative of the present invention acts upon cells producing a protein of the invention by binding to the DNA or mRNA encoding the protein to inhibit its transcription or translation, and to promote the degradation of mRNA, and has an effect of suppressing the function of the protein of the invention by suppressing the expression of the protein.

10 The antisense oligonucleotide derivative of the present invention can be made into an external preparation such as a liniment and a poultice by mixing with a suitable base material, which is inactive against the derivatives.

Also, as needed, the derivatives can be formulated into tablets, 15 powders, granules, capsules, liposome capsules, injections, solutions, nose-drops, and freeze-dried agents by adding excipients, isotonic agents, solubilizers, stabilizers, preservatives, pain-killers, etc. These can be prepared using conventional methods.

The antisense oligonucleotide derivative is given to the patient 20 by directly applying onto the ailing site, by injecting into the blood vessel and such, so that it will reach the ailing site. An antisense-mounting material can also be used to increase durability and membrane-permeability. Examples are, liposome, poly-L lysine, lipid, cholesterol, lipofectin, or derivatives of them.

25 The dosage of the antisense oligonucleotide derivative of the present invention can be adjusted suitably according to the patient's condition and used in desired amounts. For example, a dose range of 0.1 to 100 mg/kg, preferably 0.1 to 50 mg/kg can be administered.

The antisense oligonucleotide derivative of the present 30 invention is useful in inhibiting the expression of the protein of the invention, and therefore is useful in suppressing the biological activity of the protein of the invention. Also, expression-inhibitors comprising the antisense oligonucleotide derivative of the present invention are useful, because of their capability to suppress the 35 biological activity of the protein of the invention.

Proteins of this invention are useful for screening compounds

binding to the protein. That is, the proteins are used in the method of screening for compounds that bind to the proteins of this invention, in which the method comprises bringing proteins of this invention into contact with a test sample that is expected to contain a compound
5 to bind to the proteins and selecting a compound with the activity to bind to the proteins of this invention.

Proteins of this invention used in the screening may be any of recombinant, natural or partial peptides. Also they may be a purified protein, partial peptides thereof, or in the form of proteins expressed
10 on the cell surface or membrane fractions. Samples to be tested are not limited, but may be cell extracts, culture supernatants, fermented products of microorganisms, extracts of marine organisms, plant extracts, purified or partially purified proteins, peptides, non-peptide compounds, synthetic low molecular compounds, or natural
15 compounds. The protein of the invention may be exposed to the sample as a purified protein or soluble protein, in a form bound to a support, as a fusion protein with another protein, in a form expressed on the surface of cell membrane, or as membrane fractions.

A protein of the invention may be used to screen for proteins
20 that bind to the protein (such as ligands) using a variety of methods known to one skilled in the art. These screening can be carried out, for example, by the immunoprecipitation method. Specifically, the method can be carried out as follows. The gene encoding the protein of this invention is expressed by inserting the gene into a vector
25 for foreign gene expression like pSV2neo, pCDNA I, pCD8, and such, and expressing the gene in animal cells, etc. Any generally used promoters may be employed for the expression, including the SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol. 3. Academic Press, London, p.83-141 (1982)), EF-1 α promoter (Kim, et
30 al. Gene 91: 217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa, et al. Gene 108: 193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen, Methods in Enzymology 152: 684-704 (1987)), SR α promoter (Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8: 466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen
35 and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al., Mol. Cell. Biol. 9: 946 (1989)), HSV TK

promoter, etc. Transfer of a foreign gene into animal cells for its expression can be performed by any of the following methods, including the electroporation method (Chu, G. et al., Nucl. Acid Res. 15: 1311-1326 (1987)), the calcium phosphate method (Chen, C. and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7: 2745-2752 (1987)), the DEAE dextran method (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12: 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4: 1642-1643 (1985)), the lipofectin method (Derijard, B. Cell. 7: 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5: 22-30 (1993)), Rabindran, S. K. et al. Science 259: 230-234 (1993)), etc.

A protein of the present invention can be expressed as a fusion protein having the recognition site for a monoclonal antibody by introducing a recognition site (epitope) for a monoclonal antibody, the specificity of which has been established, into the N- or C-terminal of the protein of this invention. For this purpose, a commercial epitope-antibody system can be utilized (Jikken Igaku (Experimental Medicine) 13: 85-90 (1995)). Vectors are commercially available which are capable of expressing fusion proteins with β -galactosidase, maltose-binding protein, glutathione S-transferase, green fluorescence protein (GFP), and such, via the multi-cloning site.

To minimize the alteration of the properties of the protein of this invention due to the formation into a fusion protein, a method has been reported to prepare a fusion protein by introducing only a small epitope portion comprising several to ten amino acid residues. For example, the epitopes of polyhistidine (His-tag), influenza hemagglutinin (HA), human c-myc, FLAG, Vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-GP), T7 gene 10 protein (T7-tag), human herpes simplex virus glycoprotein (HSV-tag), E-tag (epitope on the monoclonal phage), and such, and monoclonal antibodies to recognize these epitopes can be utilized as the epitope-antibody system for screening proteins binding to the protein of this invention (Jikken Igaku (Experimental Medicine) 13, 85-90 (1995)).

In the immunoprecipitation, immune complexes are formed by adding these antibodies to the cell lysate prepared using suitable surfactants. This immune complex consists of a protein of this invention, a protein capable of binding to the protein, and an antibody. The

immunoprecipitation can also be performed using an antibody to a protein of this invention besides antibodies to the above-described epitopes. An antibody to a protein of this invention can be prepared by inserting a gene encoding a protein of this invention into an appropriate
5 expression vector for *E. coli* to express it in the bacterium, purifying the protein thus expressed, and immunizing rabbits, mice, rats, goats, chicken, and such, with the purified protein. The antibody can also be prepared by immunizing the above-described animals with partial peptides of the protein of this invention.

10 Immune complexes can be precipitated using, for example, Protein A Sepharose and Protein G Sepharose in case where the antibody is a murine IgG antibody. In addition, in the case where the protein of this invention is prepared as a fusion protein with the epitope of, for example, GST, and such, the immune complex can be formed using
15 a substance that specifically binds to these epitopes, such as glutathione-Sepharose 4B, and such, giving the same result as in the case where the antibody for the protein of this invention is used.

Immune precipitation, in general, may be carried out according to, or following the method described in the literature (Harlow, E.
20 and Lane, D.: Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)).

SDS-PAGE is generally used for the analysis of immunoprecipitated proteins, and bound proteins can be analyzed based on the molecular weights of proteins using a gel of an appropriate concentration. In
25 this case, although proteins bound to a protein of this invention, in general, are hardly detectable by the usual protein staining method, such as Coomassie staining and silver staining, the detection sensitivity can be improved by culturing cells in a medium containing the radio isotope-labeled ³⁵S-methionine and ³⁵S-cysteine to label
30 proteins inside the cells, and detecting the labeled proteins. Once the molecular weight of the protein is determined, the desired protein can be purified directly from SDS-polyacrylamide gel and sequenced.

In addition, screening of proteins binding to a protein of the present invention can be also performed using the West-western blotting
35 method (Skolnik, E. Y. et al., Cell 65: 83-90 (1991)). Specifically, cDNA is isolated from cells, tissues and organs (for example, tissue,

cell or cultivated cell of heart, placenta, testis, thymus, peripheral leukocyte, etc.) in which protein binding to the protein of this invention is expected to be expressed, and transferred into a phage vector (for example, λ gt11, ZAPII etc.), to prepare a cDNA library, 5 which is then expressed on plates coated with a growth medium. The protein thus expressed is fixed on a filter, which is then reacted with the labeled, purified protein of this invention, and plaques expressing proteins bound to the protein of this invention can be detected by the label. Methods for labeling a protein of this invention 10 include methods utilizing the binding activity of biotin and avidin, methods utilizing antibodies specifically binding to the protein of this invention, or peptides or polypeptides (for example, GST etc.) fused with the protein of this invention, methods utilizing the radioisotopes, methods utilizing fluorescence, etc.

15 Further, another embodiment of the screening method of this invention is exemplified by a method utilizing the 2-hybrid system using cells (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. 10: 286-292 (1994); Dalton S, and Treisman R, "Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element." 20 Cell 68: 597-612 (1992); "MATCHMARKER Two-Hybrid System", "Mammalian MATCHMARKER Two-Hybrid Assay Kit", "MATCHMARKER One-Hybrid System" (Clontech); "HybriZAP Two-Hybrid Vector system" (Stratagene)). In the two-hybrid system, a protein of the invention may be fused to the DNA binding domain of SRF or GAL4, and expressed in yeast. A cDNA 25 library is constructed from cells predicted to express proteins that bind to the protein of the present invention, wherein the cDNA library is constructed in such a way that the proteins are expressed as fusion proteins with transcription activation regions of VP16 or. The cDNA library is transfected into the above yeast, and then positive clones 30 are detected to isolate the cDNA derived from the library (Expression of a protein that binds to the protein of the invention in yeast leads to the binding of the two proteins, and results in the activation of the reporter gene, which allows to detect positive clones). The protein encoded by the isolated cDNA may be obtained by introducing 35 the cDNA into *E. coli* and expressing it therein. Thus, it is possible to prepare proteins that binds to a protein of the invention and genes

encoding them. The reporter gene used in the two-hybrid system may be such as HIS3, Ade2, LacZ, CAT, luciferase, or PAI-I (plasminogen activator inhibitor type I), but is not limited thereto.

Screening for compounds, which bind to a protein of this invention, can be also carried out using affinity chromatography. For example, the protein of this invention is immobilized on a carrier in the affinity chromatography column, to which a test sample, which is expected to express a protein binding to the protein of this invention, is applied. Samples may be cell extracts, cell lysates, or else. After applying the test sample, the column is washed, and protein which binds to the protein of the invention can be obtained.

The obtained protein may be analyzed for its amino acid sequence to synthesize oligonucleotide probes, which may be used to screen a cDNA library to obtain a DNA encoding the protein.

A biosensor that utilizes surface plasmon resonance may be used to detect or measure the bound compound. Such sensor (as BIAcore (Pharmacia)) may enable to observe the interaction at real time using a small amount of protein without the need of labeling. Thus, it is possible to assess the interaction between the protein of the invention and samples using such biosensor as BIAcore.

Moreover, compounds that bind to a protein of the invention (including agonists and antagonists), which compounds are not always proteins, may be isolated using a variety of methods known to one skilled in the art. For instance, the protein of the invention may be fixed and exposed to synthetic compounds, a bank of natural compounds, or a random phage peptide library to screen a molecule that binds to the protein. Alternatively, high throughput screening using combinatorial chemistry may be performed (Wrighton NC, Farrel FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson DL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ., "Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin." Science (UNITED STATES) 273: 458-464 (Jul 26 1996); Verdine G.L., "The combinatorial chemistry of nature." Nature (ENGLAND) 384: 11-13 (Nov 7 1996); Hogan JC Jr., "Directed combinatorial chemistry." Nature (ENGLAND) 384: 17-9 (Nov 7 1996)).

Screening of a ligand that binds to a protein of the invention

may be performed as follows. The extracellular domain of the protein of the invention is fused to the intracellular domain including the transmembrane domain of a hemopoietin receptor protein that has a known signal transducing ability to prepare a chimeric receptor. The
5 chimeric receptor may be expressed on the cell surface of an appropriate cell line, favorably a cell line that is capable of growing only in the presence of an appropriate growth factor (growth factor-dependent cell line). Then, the cell line may be cultured in medium supplemented with a sample material in which a variety of growth factors, cytokines,
10 or hematopoietic factors might be expressed. According to this method, the growth factor-dependent cell line can only survive and proliferate when the sample contains an appropriate ligand that specifically binds to the extracellular domain of the protein of the invention. The known hemopoietin receptor, such as thrombopoietin receptor, erythropoietin
15 receptor, G-CSF receptor, and gp130 may be used. The partner for constructing a chimeric receptor for the screening system of the present invention is not limited to the above receptors as long as its intracellular domain provides a structure necessary for the signal transduction activity. The growth factor-dependent cell line may be
20 an IL-3-dependent cell line such as BaF3 or FDC-P1.

In a rare case, the ligand that specifically binds to a protein of the invention may not be a soluble protein but a membrane-bound protein. In this case, screening can be performed using a protein comprising only the extracellular domain of the protein of the invention,
25 or a fusion protein in which the extracellular domain is attached to a part of other soluble proteins. Such proteins are labeled before they are used for measuring the binding with the cells that are expected to express the ligand. The former protein comprising only the extracellular domain may be a soluble receptor protein artificially
30 constructed through introducing a stop codon into the N-terminal region of the transmembrane domain, or a soluble protein such as NR10.2. The latter fusion protein may be a protein in which the Fc region of immunoglobulin G, or FLAG peptide is attached to the C-terminus of the extracellular domain. These labeled soluble proteins may be
35 also useful for detection by the west-western method.

A chimeric protein of the extracellular domain of a protein of

the invention and the Fc region of an antibody (such as human IgG) may be purified using a Protein A column. Such antibody-like chimeric protein retains the ligand binding ability. Thus, the protein may be appropriately labeled with an isotope and so on, and used for the screening of a ligand (Suda T. et al., Cell 175: 1169-1178 (1993)). Some cytokines such as molecules of the TNF family primarily exist in a membrane bound form, so such ligands may be isolated by exposing the antibody-like chimeric protein to a variety of cells and selecting cells by the binding ability to the protein. Alternatively, ligands may be isolated according to the same method by using cells to which a cDNA library is introduced. Furthermore, the antibody-like chimeric protein may be also used as an antagonist.

The compounds obtained by the above screening may be a candidate for drugs that activate or inhibit the activity of a protein of the invention. It is possible to use such compounds for the treatment of diseases arising from abnormal expression or functional disorder of a protein of the present invention. The compound obtained by using the screening method of the invention includes compounds resulting from the modification of the compound having the activity to bind to the protein of the invention by adding, deleting, and/or replacing a part of the structure.

When using the isolated compound or a protein of the present invention (decoy type (soluble form)) as a pharmaceutical for humans and other mammals, for example, mice, rats, guinea-pigs, rabbits, chicken, cats, dogs, sheep, pigs, cattle, monkeys, sacred baboons, chimpanzees, the isolated compound can be directly administered or can be formulated into a dosage form using known pharmaceutical preparation methods. For example, according to the need, the drugs can be taken orally, as sugar-coated tablets, capsules, elixirs and microcapsules, or parenterally, in the form of injections of sterile solutions, suspensions with water, or any other pharmaceutically acceptable liquid. For example, the compounds can be mixed with pharmacologically acceptable carriers or medium, specifically, sterilized water, physiological saline, plant-oil, emulsifiers, solvents, surfactants, stabilizers, flavoring agents, excipients, vehicles, preservatives and binders, in a unit dose form required

for generally accepted drug implementation. The amount of active ingredients in these preparations makes a suitable dosage acquirable within the indicated range.

Examples for additives which can be mixed to tablets and capsules are, binders such as gelatin, corn starch, tragacanth gum and gum arabic; excipients such as crystalline cellulose; swelling agents such as corn starch, gelatin and alginic acid; lubricants such as magnesium stearate; sweeteners such as sucrose, lactose or saccharin; flavoring agents such as peppermint, Gaultheria adenothrix oil and cherry. When the unit dosage form is a capsule, a liquid carrier, such as oil, can also be included in the above ingredients. Sterile composites for injections can be formulated following normal drug implementations using vehicles such as distilled water used for injections.

For example, physiological saline, glucose, and other isotonic liquids including adjuvants, such as D-sorbitol, D-mannnose, D-mannitol, and sodium chloride, can be used as aqueous solutions for injections. These can be used in conjunction with suitable solubilizers, such as alcohol, specifically ethanol, polyalcohols such as propylene glycol and polyethylene glycol, non-ionic surfactants, such as Polysorbate 80 (TM) and HCO-50.

Sesame oil or Soy-bean oil can be used as a oleaginous liquid and may be used in conjunction with benzyl benzoate or benzyl alcohol as solubilizers; may be formulated with a buffer such as phosphate buffer and sodium acetate buffer; a pain-killer such as procaine hydrochloride; a stabilizer such as benzyl alcohol, phenol; and an anti-oxidant. The prepared injection is generally filled into a suitable ampule.

Methods well known to one skilled in the art may be used to administer the pharmaceutical compound to patients, for example as intraarterial, intravenous, percutaneous injections and also as intranasal, transbronchial, intramuscular or oral administrations. The dosage and method for administration vary according to the body-weight and age of the patient, the administration method, and such, but one skilled in the art can suitably select them. If said compound is encodable by a DNA, said DNA can be inserted into a vector

for gene therapy to perform the therapy. The dosage and method for administration vary according to the body-weight, age, symptoms of a patient, and so on, but one skilled in the art can select them suitably.

For example, the dose of the protein (decoy type (soluble form))
5 may vary depending on the patient, target organ, disease type, and method for administration. However, it may be injected to a normal adult (body weight, 60 kg) at a dose of 100 µg to 10-20 mg per day.

For example, although there are some differences according to the symptoms, the dose of a compound that binds with the protein of
10 the present invention, or a compound that inhibits the activity of the protein of this invention is about 0.1 mg to about 100 mg per day, preferably about 1.0 mg to about 50 mg per day, and more preferably about 1.0 mg to about 20 mg per day, when administered orally to a standard adult (weight 60 kg).

15 When the protein is administered parenterally in the form of an injection to a standard adult (weight 60 kg), although there are some differences according to the patient, target organ, symptoms and method of administration, it is convenient to intravenously inject a dose of about 0.01 mg to about 30 mg per day, preferably about 0.1
20 to about 20 mg per day, and more preferably about 0.1 to about 10 mg per day. Also, in the case of other animals, it is possible to administer an amount converted to 60 kg of body-weight or surface area.

25 Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows the nucleotide sequence of AQ022781 identified in the gss database. The deduced amino acid sequence is shown under the predicted exon sequence. The YR motif and WS motif that were used as the target are boxed. Two "n" in the nucleotide sequence are also
30 boxed.

Fig. 2 shows partial amino acid sequences of NR10 found in the sequence of AQ022781, and those of known hemopoietin receptors having homology thereto. Identical residues are boxed with shadow, and similar residues are shadowed. Gap spaces are underlined. Known
35 hemopoietin receptors are, from top, human gp130 (GenBank Accession No. NM002184.1; IL6ST), human LIF receptor (GenBank Accession No.

NM002310.1; LIFR), human Oncostatin M receptor β subunit (GenBank Accession No. NM003999.1; OSMR), human IL-12 receptor β 2 subunit (GenBank Accession No. NM001559.1; IL12RB2), and human NR6 (GenBank Accession No. AC003112).

5 Fig. 3 shows the nucleotide sequence of the full length NR10.1 cDNA that was obtained by combining the 5'- and 3'-RACE products. The deduced amino acid sequence encoding NR10.1 is also shown. The amino acid sequence predicted to be the secretion signal sequence is underlined. The predicted transmembrane domain is shadowed.
10 Conserved cysteine residues and the WS motif are boxed.

Fig. 4 is a continuation of Fig. 3.

Fig. 5 is a continuation of Fig. 4.

Fig. 6 shows the nucleotide sequence of the full length NR10.2 cDNA that was obtained by combining the 5'- and 3'-RACE products.
15 The deduced amino acid sequence encoding NR10.2 is also shown. The predicted secretion signal sequence is underlined. Conserved cysteine residues and the WS motif are boxed.

Fig. 7 is a continuation of Fig. 6.

Fig. 8 shows photographs demonstrating the result of RT-PCR
20 analysis of the expression pattern of the NR10.1 gene in human organs.

Fig. 9 shows photographs demonstrating the result of RT-PCR analysis of the expression pattern of the NR10.2 gene in human organs.

Fig. 10 shows a photograph demonstrating the result of quantification of the NR10.1 gene expression in human organs by Southern
25 blotting.

Fig. 11 shows a photograph demonstrating the result of quantification of the NR10.2 gene expression in human organs by Southern blotting.

Fig. 12 is a schematic illustration of the structure of the protein
30 to be expressed from the expression vector construct.

Fig. 13 shows the nucleotide sequence of the full length NR10.3 cDNA. The deduced amino acid sequence encoding NR 10.3 is also shown. The predicted secretion signal sequence is underlined. The amino acid sequence predicted to be the transmembrane domain is colored.
35 Conserved cysteine residues and the WS motif are boxed.

Fig. 14 is a continuation of Fig. 13.

Best Mode for Carrying Out the Invention

This invention will be explained in detail below with reference to examples, but it is not construed as being limited thereto.

5

[Example 1] Isolation of NR10.1 and NR10.2 genes

(1) BLAST search

The inventors aimed at finding another motif conserved among the hemopoietin receptor family, in addition to the Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser motif (WS motif), in order to design an oligonucleotide probe including both motifs together. The inventors examined the sequence of other regions for another motif. As a result, they found a tyrosine or histidine residue in the extracellular domain of the family proteins, located 13 to 27 amino acids upstream of the WS motif, that is conserved at high frequency. They further examined the six amino acid residues located to the C-terminus from the Tyr/His residue for a consensus sequence that appears with a high-frequency, and found the amino acid following sequence: (Tyr/His)-Xaa-(Hydrophobic/Ala)-(Gln/Arg)-Hydrophobic-Arg (referred to as the YR motif in the following). However, the YR motif is not considered as a perfect consensus sequence, and also the combination of nucleotide sequences that can encode the motif is really complicated. Thus, it seemed very difficult to synthesize all the nucleotide sequences that encode the amino acid sequence and provide them as the probe for hybridization, a practical method of screening, or as the primer for RT-PCR.

Accordingly, the inventors examined for a specific method of screening for a novel hemopoietin receptor using the above motifs as the probe. As a result, they found it reasonable to perform a database search on computer using a query composed of a partial amino acid sequence of known hemopoietin receptors, a fragment including both motifs.

First, amino acid sequences that fulfilled the necessary condition to contain both motifs were designed to prepare a query for database search. Although the receptor family normally contains a spacer of 7 to 10 amino acids between the motifs, the spacer was

fixed to 10 amino acids by taking average. It was expected that even if the length of spacer in target genes were different from that in the query, the gap would be filled by space so that it would not interfere the search. Moreover, the number of undetermined residues was
5 minimized so as to increase the quality of the sequence and improve the sensitivity of detection. Thus, based on the sequence that appeared frequently in known hemopoietin receptors, three patterns were designed tentatively for the YR motif, two residues on both ends of the spacer, and the residues at the center and the C-terminus of the
10 WS motif, respectively, as in Table 1.

Table 1

YR motif	spacer amino acids	WS motif
YTVQVR	AR XXXXXX GT	WSEWSP
YEARVR	VQ XXXXXX GY	WSDWSE
YSLQLR	CK XXXXXX GI	WSPWSQ

15 Combining the YR motif, spacer and the WS motif described in Table 1 gives 27 different queries. The queries were used to search the nr database in GenBank using the TblastN program (Advanced TblastN 2.0.8). Parameters for search were set as Expect value = 100, Descriptions = 100, and Alignments = 100. As a result, many of known
20 hemopoietin receptors were identified positive, confirming that the method was working correctly. Then, the same queries were used to search on the EST database as well as the gss and htgs database in order to detect a sequence that could encode a novel hemopoietin receptor. However, the result did not yield any positive clones that appeared
25 novel. It was considered that the limited variety of the above-mentioned 27 queries is the cause of the result. Accordingly, further preparation of a variety of sequences for the query was attempted, but the combination of the sequence became too complicated to continue the preparation manually. After all, the inventors decided to use
30 partial amino acid sequences of known hemopoietin receptors that were fragmented so as to include both of the YR and WS motifs in order to prepare a query for database search.

Comparison of the genomic structure of the receptor family

revealed that the YR and WS motifs are contained within a single exon in all examined known hemopoietin receptors. This suggests that the continuity and compatibility of both motifs may be also retained in the genomic sequence. Therefore, it was expected that the exon of
5 a known hemopoietin receptor encoding both motifs are effective as the query to search for the target gene on the EST database, and the genomic database as well. Herein, human gp130 and human LIF receptor sequences were used as the known hematopoietin receptor sequence, because their structures have a relatively high similarity among the
10 receptor family, and the similarity is expected to be shared in the target novel receptor. While the sequences of human gp130 and human LIF receptor were already known, the inventors used the amino acid sequence encoded by the cDNA that had been isolated by the inventors themselves using plaque hybridization and RT-PCR with a probe encoding
15 the WS motif.

Based on the genomic structure, it is known that hemopoietin receptors are to contain an exon encoding the YR and WS motifs having a length of 50 to 70 amino acids. Accordingly, 29 amino acids to the N-terminus and 30 amino acids to the C-terminus from the first Tyr
20 residue in the YR motif, a total of 60 amino acids were cut out of the sequence of human gp130 and human LIF receptor to prepare a query sequence for convenience' sake. The LIF receptor contains two WS motifs, and the second (on the C-terminal side) WS motif was selected taking into account the conservation of the YR motif. The above queries were
25 used to search on the gss (Genomic Survey Sequence) and htgs database in GenBank using TblastN (Advanced TblastN 2.0.8). Parameters were set as Expect value = 50, Descriptions = 100, and Alignments = 100.

The length of the selected query sequence, 60 amino acids, was not exactly the same as that of the actual exon sequence. However,
30 taking into account that the length of this exon in known hemopoietin receptor genes differ somewhat according to each gene, and by taking the conservation of both YR and WS motifs as the index into much consideration it was decided that the difference may not interfere with the search. The gss and htgs database was used because these
35 genomic sequences has not been fully analyzed due to its complexity, and thus, it was expected that they are suitable for identifying novel

receptor genes. Since the queries were longer than the previous 27 artificial queries, parameters "Expect value = 50, Descriptions = 100, and Alignments = 100" were set to reduce the sensitivity of detection so as to avoid increase of false positive clones that have
5 homology to a region other than the motifs. Thus, it was expected that this enables detection of target genes by suppressing detection of such false positive clones showing homology at sequences other than the target motif sequence.

As a result, the search resulted in many hits of false positive
10 clones, and those clones in which both YR and WS motifs were not encoded in the same reading frame, or that contained a stop codon between the motifs were discarded. Also, those clones containing only the YR motif but not the WS motif were discarded, because, as mentioned above, the YR motif is not a completely established consensus sequence.
15 Therefore, the conservation of the WS motif was considered predominant. As a result, a single clone containing the human genomic sequence (GenBank Accession No. AQ022781) expected to encode a part of a novel hemopoietin receptor gene was selected, and the gene was named NR10.

AQ022781 is the terminal sequence of a BAC clone consisting of
20 459 bp, deposited in the gss database. It was the only clone that was also positive in both searches using partial amino acid sequences of human gp130 or LIF receptor as the query respectively. It was presumed that the reliability of the sequence might be low due the existence of two "n" in the middle and the nature of the deposition
25 system of the Genomic Survey Sequence. Nevertheless, as shown in Figure 1, a splice consensus sequence could be recognized as the "ag" sequence following the "c/t" rich sequence at 175th to the 218th bases, and it was predictable that it contains an exon starting from "atg" following the splice consensus sequence. Then, the predicted exon sequence was
30 used to search on the nr database in GenBank using BlastX (Advanced BlastX 2.0.8). The results revealed that the exon has homology to many known hemopoietin receptor genes as shown in Fig. 2. The result was: (1) AQ022781 contains an YR motif, sequence [YVIALR], and that it retained a complete WS motif, sequence [WSDWS]; (2) showing homology
35 with several known hemopoietin receptors, and (3) both of the two Ser residues in the WS motif are encoded by AG(C/T). And thus, it

was predicted that the gene could encode a novel hemopoietin receptor gene. The codon for Ser in the WS motif is generally AG(C/T) in most of the known hemopoietin receptors, but the second Ser residue in the EPO receptor, TPO receptor, and mouse IL-6 receptor is encoded by TCN. Indeed, most of the false positive clones containing by chance a WS motif-like sequence, the second Ser was mostly encoded by TCN. Thus, the Ser residue encoded by the AG(C/T) codon could be used as a marker for selection of positive clones. Accordingly, specific oligonucleotide primers were designed from the predicted exon sequence on AQ022781, and used for 5'-RACE and 3'-RACE method as below.

(2) Design of oligonucleotide primers

As described in (1), exon sites were predicted on AQ022781 sequences, and these sequences were used to design the following oligonucleotide primers specific for NR10. Three sense primers (NR10-S1, NR10-S2, and NR10-S3; oriented downstream) and three antisense primers (NR10-A1, NR10-A2, and NR10-A3; oriented upstream) were synthesized using the ABI 394 DNA/RNA synthesizer under a condition to attach a trityl group to the 5'-terminus. Then, the products were purified using an OPC column (ABI #400771) to obtain full-length primers.

NR10-S1: 5'-ATG GAA GTC AAC TTC GCT AAG AAC CGT AAG-3' (SEQ ID NO: 5)

NR10-S2: 5'-CCA AAC GTA CAA CCT CAC GGG GCT GCA ACC-3' (SEQ ID NO: 6)

NR10-S3: 5'-GTC ATA GCT CTG CGA TGT GCG GTC AAG GAG-3' (SEQ ID NO: 7)

NR10-A1: 5'-agt agc ttg cgT TCT TCC TCA GCT ATT CCC-3' (SEQ ID NO: 8)

NR10-A2: 5'-CTT TGA CTC CTT GAC CGC ACA TCG CAG AGC-3' (SEQ ID NO: 9)

NR10-A3: 5'-GGT TGC AGC CCC GTG AGG TTG TAC GTT TGG-3' (SEQ ID NO: 10)

The "n" at position 376 in AQ022781 sequence (Fig. 1) was assigned to be base "c" to design the primer sequences above, and thus, corresponding base at position 11 in NR10-A1 primer sequence

was designed "g". According to the analysis of the consensus sequence for splicing the minimal exon on A0022781 sequence was predicted to be starting from base "a" at position 211 to base "c" at position 399, the intron starting from the next "gt" sequence. However, the analysis of 3'-RACE products as described later revealed that the intron starts from the base "n" at position 376 or from base "g" at position 377. Therefore, as a result, the 11 bases shown in small caps of NR10-A1 primer sequence above can't bind correctly during PCR, while the corresponding sequence is not transcribed into mRNA. However, PCR reactions proceeded correctly, probably because the other 19 bases, the 3'-terminal sequences, were capable of annealing specifically.

(3) Cloning of the C-terminus cDNA by 3'-RACE method

In order to isolate the full-length cDNA of NR10, 3'-RACE PCR was performed using NR10-S1 and NR10-S2 primers described in (2) for primary and secondary PCR, respectively. PCR experiment was performed using Human Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Library (Clontech #7403-1) as the template, and Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech #8417-1) on a thermal cycler (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400). Under the following conditions, as a result, PCR products showing two different sizes by alternative splicing were obtained.

Condition of the primary PCR was as follows: a single cycle of "94°C for 4 min", 5 cycles of "94°C for 20 sec, and 72°C for 100 sec", 5 cycles of "94°C for 20 sec, and 70°C for 100 sec", 28 cycles of "94°C for 20 sec, and 68°C for 100 sec", a single cycle of 72°C for 3 min, and termination at 4°C.

Condition of the secondary PCR was as follows: a single cycle of "94°C for 4 min", 5 cycles of "94°C for 20 sec, and 70°C for 100 sec", 25 cycles of "94°C for 20 sec, and 68°C for 100 sec", a single cycle of 72°C for 3 min, and termination at 4°C.

Two amplification products were obtained by the PCR and both of them were subcloned into the pGEM-T Easy vector (Promega #A1360), and the nucleotide sequences were determined. The transformation of the PCR product into the pGEM-T Easy vector was performed using T4 DNA ligase (Promega #A1360) in a reaction of 12 hrs at 4°C. Recombinants

of the PCR products and pGEM-T vector were obtained by the transformation of *E. coli* DH5 α strain (TOYOBO #DNA-903). Recombinants were selected by using Insert Check Ready Blue (TOYOBO #PIK-201). The nucleotide sequences were determined using the BigDye Terminator Cycle Sequencing SF Ready Reaction Kit (ABI/Perkin Elmer #4303150) and by analyzing with the ABI PRISM 377 DNA Sequencer. Nucleotide sequences of the whole insert fragment of six independent clones were determined. As a result, they were divided into two groups, each composed of 3 clones, based on the difference in length and sequence of the base pairs. It was confirmed that the difference of the product resulted from alternative splicing, and both of the obtained sequences are partial nucleotide sequences of NR10. The cDNA clone possibly encoding the long ORF including the transmembrane region was named as NR10.1, and the other possibly encoding a short ORF without the transmembrane region was named as NR10.2.

(4) Cloning of the N-terminal cDNA by 5'-RACE

In order to isolate the full-length cDNA of NR10, 5'-RACE PCR was performed using NR10-A1 and NR10-A2 primers of Example 2 for primary and secondary PCR, respectively. As in 3'-RACE, PCR experiment was performed using Human Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Library as the template, and Advantage cDNA Polymerase Mix on a thermal cycler (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400). Under the same condition to those described in (3), PCR products of three different sizes were obtained. All of the three products were subcloned into the pGEM-T Easy vector as described above to determine the nucleotide sequence. The transformation of the PCR products into the pGEM-T Easy vector was performed using T4 DNA ligase in a reaction for 12 hrs at 4°C. The recombinants of the PCR products and pGEM-T vector were obtained by transformation of *E. coli* DH5 α strain, and selection of the recombinants were done using Insert Check Ready Blue as described above. The nucleotide sequences were also determined as above using the BigDye Terminator Cycle Sequencing SF Ready Reaction Kit and the ABI PRISM 377 DNA Sequencer for analysis. The result revealed that the obtained three 5'-RACE products with different sizes were derived from the same mRNA transcript. The difference in size was due to incomplete

extension reaction in the 5'-RACE and the possibility was denied that they were derivatives of alternative splicing. Yet, even the cDNA clone with the longest extension product among the three 5'-RACE products did not contain the 5'-terminus of the full-length sequence.

5 Furthermore, another attempt using NR10-A2 and NR10-A3 primers of (2) for primary and secondary PCR, respectively, ended in a similar result. Accordingly, in order to perform another 5'-RACE elongation reaction, new oligonucleotide primers were designed proximally to the N-terminus of the obtained nucleotide sequence. Two antisense
10 primers, NR10-A4 and NR10-A5, (upstream orientation) as below were prepared according to Example 2.

NR10-A4: 5'-ATC AGA TGA AAC AGG CGC CAA CTC AGG-3' (SEQ ID NO: 11)

NR10-A5: 5'-TGG TTT CAC ACG GAA AAT CTT AGG TGG-3' (SEQ ID NO: 12)

As described above, 5'-RACE PCR was performed using Human Fetal
15 Liver Marathon-Ready cDNA Library as the template, and NR10-A4 and NR10-A5 primer for primary and secondary PCR, respectively. Conditions for PCR, method of subcloning, and method for determining the nucleotide sequence were as those described in (3). However, results of the sequence determination revealed that again only
20 incomplete elongation products, in which the extension reaction stopped at the same site as by the 5'-RACE PCR using NR10-A1, NR10-A2, and NR10-A3 primers above, were obtained. It was possible that NR10 mRNA forms a tertiary conformation at that position so that it blocks the synthesis of primary cDNA strand. There is also the possibility
25 that the nucleotide sequence of the upstream region from that position might have a high G/C content, which could block the PCR reaction. Anyway, it might be the case that the quality of the library used to prepare the cDNA library might have been low. Accordingly, the template for PCR was substituted with Human Placenta Marathon-Ready
30 cDNA library (Clontech #7411-1) as described in the following. This human Placenta derived material was chosen according to the result tissue distribution of NR10 gene by RT-PCR analysis described later.

35 (5) Cloning of the N-terminal cDNA through continuous extension by 5'-RACE

To isolate the N-terminal sequence of a cDNA clone corresponding

to the full length NR10, 5'-RACE PCR was performed using NR10-A4 and NR10-A5 primers of (4) for primary and secondary PCR, respectively. Human Placenta Marathon-Ready cDNA library was used as the template due to reasons mentioned above. Advantage cDNA Polymerase Mix was used in the PCR experiment. 5'-RACE PCR was conducted using the thermal cycler Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 under the following conditions to obtain a PCR product of single size.

The condition for primary PCR was as follows: a single cycle of "94°C for 4 min", 5 cycles of "94°C for 20 sec, and 72°C for 2 min", 5 cycles of "94°C for 20 sec, and 70°C for 2 min", 28 cycles of "94°C for 20 sec, and 68°C for 90 sec", a single cycle of 72°C for 3 min, and termination at 4°C.

The condition for secondary PCR was as follows: a single cycle of "94°C for 4 min", 5 cycles of "94°C for 20 sec, and 70°C for 90 sec", 25 cycles of "94°C for 20 sec, and 68°C for 90 sec", a single cycle of 72°C for 3 min, and termination at 4°C.

The obtained PCR product was subcloned into pGEM-T Easy vector as described in Example 3, and the nucleotide sequence was determined. The nucleotide sequences of the whole insert fragment from 4 independent clones of transformants revealed that the clones contain the N-terminal sequence of the full length NR10 cDNA clone. Then, the nucleotide sequence determined by the 5'-RACE-PCR and those determined by 3'-RACE in (3) were combined to finally obtain the full length nucleotide sequence of full length NR10.1 and NR10.2 cDNA. The nucleotide sequence determined for NR10.1 cDNA (SEQ ID NO: 1) and the amino acid sequence encoded by the sequence (SEQ ID NO: 2) are shown in Fig. 3 to 5. The nucleotide sequence determined for NR10.2 cDNA (SEQ ID NO: 3) and the amino acid sequence encoded by the sequence (SEQ ID NO: 4) are shown in Fig. 6 and 7.

According to the determination of the full-length nucleotide sequence of NR10 cDNA, it was revealed that the "n" at position 281 of AQ022781 (Fig. 1) was actually "t". Whereas, the "n" at position 376 was not determined because the intron starts from the base around this "n". Nevertheless, no matter which nucleotide is used to replace the "n" at position 376, the sequence did not give a consensus sequence for splicing (ag/gtaag etc.). Considering the features of the

information of the gss database, it was presumed that the sequence [an/gcaag] around the "n" at position 376 was actually [ag/gtaag]. Determination of the full-length nucleotide sequence of NR10.1 and NR10.2 revealed that these two genes are connected to a different
5 exon at the object obscure splicing site through alternative splicing, and the C-terminus thereafter encoded different amino acid sequences. Their primary structure indicates that NR10.1 may encode a transmembrane type hemopoietin receptor protein consisting of 652 amino acids, and that NR10.2 may encode a soluble secretion type
10 receptor-like protein consisting of 252 amino acids. The structural features of these NR10 are as follows:

First, it is predicted that the sequence from the 1st Met to the 32nd Ala in the common extracellular domain of NR10.1 and NR10.2 is the typical secretion signal sequence. Herein, the 1st Met is
15 presumed to be the translation initiation site because there exists an in frame termination codon at the (-2) position. Next, a typical ligand-binding domain exists in the region from the 43rd Cys to the 53rd Cys or the 55th Trp residue. In addition, the 81th and 94th Cys correspond to the Cys residue repeat conformation well conserved among
20 other hemopoietin receptor family. Furthermore, a Pro-rich region (PP-W motif) beginning at the consecutive Pro residues at positions 137 and 138 to the 157th Trp residue is conserved, and residues from the 210th Tyr to 215th Arg corresponds to the YR motif above. A typical
WSXWS-box (WS motif) is also found at residues from the 224th Trp
25 to 228th Ser.

The open reading frame (ORF) of NR10.2 encodes 24 amino acids from the WSXWS sequence and terminates at the stop codon thereafter. Thus, it encodes a soluble hemopoietin receptor-like protein without a transmembrane region. On the other hand, the ORF of NR10.1 contains
30 a typical transmembrane domain of 24 amino acids from the 533th Ile to the 556th Leu residue following the above motifs. In addition, the intracellular domain adjacent to the transmembrane domain contains Pro residues at positions 571 and 573, corresponding to the Box-1 consensus sequence (PXP motif) well conserved among other hemopoietin
35 receptors and is considered to be implicated in signal transduction. These features above confirm that the NR10 gene encodes a novel

hemopoietin receptor protein.

[Example 2] Tissue distribution determination and expression pattern analysis of NR10 gene by RT-PCR

5 mRNA was detected using the RT-PCR method to analyze the expression distribution and the expression patterns of NR10.1 and NR10.2 gene in different human organs. Oligonucleotide primers with the following sequences were synthesized for RT-PCR analysis. NR10-S0 primer was used as a sense primer (downstream orientation), and
10 NR10.1-A0 and NR10.2-A0 primer were used as antisense primers (upstream orientation). The primers were synthesized and purified as described in Example 2. While NR10-S0 was designed so as to correspond to common sequences of NR10.1 and NR10.2, NR10.1-A0 and NR10.2-A0 were designed according to specific sequences of NR10.1 and NR10.2, respectively.

15 hNR10-S0: 5'-GCA TTC AGG ACA GTC AAC AGT ACC AGC-3' (SEQ ID NO: 13)

hNR10.1-A0: 5'-AGC TGG AAT CCT CAG GGT GGC CAC TGG-3' (SEQ ID NO: 14)

hNR10.2-A0: 5'-GCC CAT CAC CAG AGT AGA CAG GAC GGG-3' (SEQ ID NO: 15)

20 The templates used were Human Multiple Tissue cDNA (MTC) Panel I (Clontech #K1420-1), Human MTC Panel II (Clontech #K1421-1), Human Immune System MTC Panel (Clontech #K1426-1), and Human Fetal MTC Panel (Clontech #K1425-1). PCR was performed using Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech #8417-1) on a thermal cycler (Perkin Elmer
25 Gene Amp PCR System 2400). NR10-S0 and NR10.1-A0 were used in pair for the detection of NR10.1. For the detection of NR10.2, [NR10-S0 and NR10.2-A0] primer set was used. PCR was performed by following condition to amplify the target gene: a single cycle of "94°C for 4 min", 5 cycles of "94°C for 20 sec, and 72°C for 1 min", 5 cycles of
30 "94°C for 20 sec, and 70°C for 1 min", 25 cycles of "94°C for 20 sec, and 68°C for 1 min", a single cycle of 72°C for 3 min, and termination at 4°C.

As shown in Fig. 9, the result was that constitutive gene expression of NR10.2 was detected at almost a constant level in all
35 examined human organs and tissues derived mRNA. In contrast, as shown in Fig. 8, NR10.1 gene expression was detected in restricted tissues

or organs, and its expression level varied significantly. Performing PCR using human G3PDH primers under the above condition and detecting the expression of the house-keeping gene G3PDH, it was confirmed that the number of mRNA copies among the template mRNA had been normalized.

5 The expression of NR10.1 gene was found in organs as follows: in human adult, it was strongly expressed in heart, placenta, testis, thymus, and peripheral leukocytes, while weak expression was detected in spleen, bone marrow, prostate, ovary, pancreas, and lung; in human fetus, strong expression was detected in skeletal muscle, thymus, heart,
10 and kidney, while weak expression was detected in lung, liver, and spleen. On the other hand, no expression could be detected in brain, skeletal muscle, kidney, small intestine, or colon in human adult, nor in fetal brain.

The size of the PCR amplification product was 480 bp and 243
15 bp for NR10.1 and NR10.2, respectively, which was consistent with the sizes calculated from the determined nucleotide sequences. Thus, the products were considered to be products of specific PCR amplification reaction. This was further confirmed by Southern blotting as in the following, and the possibility of that they were
20 non-specific PCR amplification products was denied.

Due to the fact that a strong expression of NR10.1 gene was mainly detected in those organs containing immune responsible cells and hematopoietic cells and considering the gene expression distribution of NR10.1, the possibility that NR10 functions as a novel hemopoietin
25 receptor was strongly suggested. Additionally, the fact that the expression was also distributed among cells of the genital system and the endocrine system as well as in heart suggested that NR10 could regulate not only the immune system and hematopoietic system but also diverse physiological functions in the body as well.

30 The fact that expression of NR10.2 was detected in all organs indicates the possibility that cells constituting the subject organs of the analysis produce active secretory type protein. It is possible that the expression of NR10 gene is strictly regulated in particular tissues or cell populations through transcriptional regulation and
35 alternative splicing that determines the functional specificity of these tissues and cells.

[Example 3] Verification of the specificity of PCR products by Southern blotting

In order to verify the specificity of amplification, the RT-PCR
5 amplified target gene product in Example 2 was subjected to Southern
blotting using cDNA fragments specific for NR10.1 and NR10.2,
respectively, as a probe. At the same time, the amount of RT-PCR product
was quantitatively detected to assess relative gene expression levels
among different human organs. The RT-PCR product was electrophoresed
10 on an agarose gel, blotted onto a charged nylon membrane (Hybond N(+),
Amersham cat#RPN303B), and subjected to hybridization. cDNA
fragments of NR10.1 and NR10.2 obtained in Example 3 were used as
probes specific for respective genes. Probes were prepared using the
Mega Prime Kit (Amersham cat#RPN1607), and labeled with radioisotope,
15 [α -³²P]-dCTP (Amersham cat#AA0005). Hybridization was performed
using Express Hyb-ridization Solution (Clontech #8015-2), and after
the prehybridization at 68°C for 30 min, heat denatured labeled probe
was added to conduct hybridization at 68°C for 120 min. After subsequent
wash in (1) 1x SSC/0.1% SDS at room temperature for 5 min, (2) 1x
20 SSC/0.1% SDS at 50°C for 30 min, and (3) 0.1x SSC/0.1% SDS at 50°C
for 30 min, the membrane was exposed to an Imaging Plate (FUJI #BAS-III),
and NR10 specific signal was detected using the Image Analyzer (FUJIX,
BAS-2000 II).

Detected results for NR10.1 and NR10.2 are shown in Fig. 10 and
25 11, respectively. The amplified product in the previous RT-PCR was
verified as specific amplification products of respective genes.
Furthermore, the result of quantification of relative expression level
among each tissues supported above-mentioned assessment. The
detection method for target gene expression using RT-PCR and Southern
30 blotting in combination is known to have extremely high sensitivity
as compared to other methods for expression analysis. Nevertheless,
NR10.1 expression was not detected in the neuronal system such as
adult and fetal brains, in adult digestive tissues. Moreover, no
expression was detected in adult skeletal muscle or kidney, where
35 strong expression was recognized in fetus.

[Example 4] Northern blot analysis of NR10 gene expression

Northern blot analysis of NR10 gene expression was performed to examine the expression pattern of NR10 gene in human organs and human tumor cell lines, and to determine the size of NR10 transcripts.

5 In addition, the possibility of whether splice variants other than NR10.1 or NR10.2 existed was examined. Human Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (Clontech #7760-1), Human MTN Blot II (Clontech #7759-1), Human MTN Blot III (Clontech #7767-1), and Human Cancer Cell Line MTN Blot (Clontech #7757-1) were used.

10 The cDNA fragments obtained by 5'-RACE in Example 1 (5) were used as the probes. Probes were prepared as described in Example 3, using the Mega Prime Kit, and labeled with [α -³²P]dCTP. Hybridization was performed using Express Hyb-ridization Solution, and after prehybridization at 65°C for 30 min heat denatured probes were added
15 to conduct hybridization at 65°C for 16 hr. After subsequent wash in (1) 1x SSC/0.1% SDS at room temperature for 5 min, (2) 1x SSC/0.1% SDS at 48°C for 30 min, and (3) 0.5x SSC/0.1% SDS at 48°C for 30 min, the membrane was exposed to an Imaging Plate as described above, and an attempt to detect NR10 specific signal was made using an Image
20 Analyzer.

The method, unexpectedly, failed to detect any signal in any of the examined human organs. This could be because Northern blotting has a significantly lower sensitivity than RT-PCR and thus failed to detect mRNA with low expression level.

25

[Example 5] Plaque screening

The above procedure utilized PCR cloning for obtaining the full-length cDNA of NR10 gene. There is always the possibility that a point mutation in the product is introduced by PCR cloning. Thus,
30 in order to reconfirm the nucleotide sequence of the above cDNA clone, plaque hybridization was performed using a lambda phage cDNA library to reisolate the target gene. Human Placenta cDNA library (Clontech #HL1144X), in which the expression of NR10 gene was confirmed as a result of NR10 gene expression analysis by RT-PCR, was used for the
35 plaque screening. The cDNA fragments obtained by 5'-RACE in Example 1 (5) were used as the probe, as above. Probes were prepared and labeled

as in Example 3, using the Mega Prime Kit, and labeled with [α - 32 P]dCTP. Hybridization was performed using Express Hyb-ridization Solution, and after prehybridization at 65°C for 30 min heat denatured probes were added to conduct hybridization at 65°C for 16 hr. After subsequent
5 wash in (1) 1x SSC/0.1% SDS at room temperature for 5 min, (2) 1x SSC/0.1% SDS at 58°C for 30 min, and (3) 0.5x SSC/0.1% SDS at 58°C for 30 min, the membrane was exposed to an X-ray film (Kodak, cat#165-1512) to detect NR10 positive plaques.

As a result, no positive clone was obtained. As described in
10 Example 4, one reason why the cDNA clone couldn't be isolated might be that the expressed copy numbers of the target gene was too small. To isolate the target gene, it is favorable to perform plaque hybridization using a lambda phage cDNA library derived from human fetal skeletal muscle, which showed the highest expression level of
15 the gene by RT-PCR analysis.

[Example 6] Ligand screening

(1) Construction of NR10 chimeric receptor

A screening system is constructed for searching a ligand, a novel
20 hemopoietin, that can specifically bind to NR10. First, the cDNA sequence encoding the extracellular region of NR10.1 (from the 1st Met to the 238th Glu or 1st Met to the 532nd Glu) was amplified by PCR, and this DNA fragment is bound in frame to DNA fragments encoding the transmembrane region and the intracellular region of a known
25 hemopoietin receptor to prepare a fusion sequence encoding a chimeric receptor. As described above, there are several candidates for the partner, the known hemopoietin receptor, and among them, the human TPO receptor (Human MPL-P) is selected. Specifically, after amplifying the DNA sequence encoding the intracellular region that
30 includes the transmembrane region of the human TPO receptor by PCR, this sequence was bound to the cDNA sequence encoding the extracellular region of NR10.1 in frame, and was inserted into a plasmid vector (pEF-BOS) expressible in mammalian cells. The constructed expression vector was named pEF-NR10/TPO-R. A schematic diagram of the structure
35 of the constructed NR10/TPO-R chimeric receptor is shown in Fig. 12. Together with an expression vector pSV2bsr (Kaken Pharmaceutical)

containing Blastcidin S resistant gene, the NR10/TPO-R chimeric receptor-expressing vector was introduced into the growth factor-dependent cell line Ba/F3, and was forced for expression. Gene-introduced cells were selected by culturing under the coexistence
5 of 8 µg/ml of Blastcidin S hydrochloride (Kaken Pharmaceutical) and IL-3. By transferring the obtained chimeric receptor-introduced cells to an IL-3-free medium, culturing by adding materials expected to contain a target ligand, it is possible to conduct screening which makes use of the fact that survival/proliferation of the cell is possible
10 only when a ligand that specifically binds to NR10 is present.

(2) Preparation of NR10/IgG1-Fc soluble fusion protein

NR10/IgG1-Fc soluble fusion protein was prepared to utilize it for searching cell membrane-bound type ligands, or to detect soluble
15 ligands through BIAcore (Pharmacia) and West-western blotting. A fusion sequence encoding the soluble fusion protein was prepared by binding the DNA fragment encoding the extracellular region of NR10.1 (from the 1st Met to the 238th Glu or 1st Met to the 532nd Glu) prepared in Example 6 (1) with the DNA fragment encoding the Fc region of human
20 immunoglobulin IgG1 in frame. A schematic diagram of the structure of the soluble fusion protein encoding the constructed NR10/IgG1-Fc is shown in Fig. 12. This fusion gene fragment was inserted into a plasmid vector (pEF-BOS) expressible in mammalian cells, and the constructed expression vector was named pEF-NR10/IgG1-Fc. After
25 forcing expression of this pEF-NR10/IgG1-Fc in mammalian cells, and selection of stable gene-introduced cells, the recombinant protein secreted into the culture supernatant can be purified by immunoprecipitation using anti-human IgG1-Fc antibody, or by affinity columns, etc.

30

(3) Construction of an expression system of NR10.2 and purification of the recombinant NR10.2 protein

The recombinant NR10.2 protein was prepared to utilize it for searching cell membrane-bound ligands, or the detection of soluble
35 ligands using BIAcore (Pharmacia) or West-western-blotting. The stop codon of the amino acid coding sequence of NR10.2 cDNA was replaced

by point mutation to a nucleotide sequence encoding an arbitrary amino acid residue, and then, was bound to the nucleotide sequence encoding the FLAG peptide in frame. This bound fragment was inserted into a plasmid vector expressible within mammalian cells, and the constructed
5 expression vector was named pEF-BOS/NR10.2 FLAG. Figure 12 shows a schematic diagram of the structure of the insert NR10.2 FLAG within the constructed expression vector. After forced-expression of this pEF-BOS/NR10.2 FLAG in mammalian cells and selection of stable gene-introduced cells, the recombinant protein secreted into the
10 culture supernatant can be immunoprecipitated using anti-FLAG peptide antibody, or may be purified by affinity columns, etc.

[Example 7] Isolation of NR10.3 gene

(1) Design of oligonucleotide primers

15 Isolation of NR10.1 gene was conducted again to obtain the cDNA comprising a continuous full-length coding sequence. First, 5'-UTR and 3'-UTR within the nucleotide sequence of NR10.1 cDNA was selected to design sense and antisense primers (downstream and upstream orientation, respectively) with sequences as follows. Primers were
20 synthesized as in Example 1 (2) on an ABI 394 DNA/RNA Synthesizer under the condition where a trityl group was attached to the 5'-terminus. The product was purified using an OPC column (ABI #400771) to obtain full-length primers.

NR10-5UTR (SN); 5'-CCC CTG ATA CAT GAA GCT CTC TCC CCA GCC-3' (SEQ
25 ID NO: 18)

NR10-3UTR (AS); 5'-CCA GTC TTC GGA GAT GGT TCT CTT GGG GCC-3' (SEQ
ID NO: 19)

(2) PCR cloning

30 In order to isolate the full length CDS of NR10, PCR cloning was performed using NR10-5UTR and NR10-3UTR primers as sense and antisense primers, respectively. Human Placenta Marathon-Ready cDNA Library (Clontech #7411-1) was used as the template. PCR experiment was performed using the Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech
35 #8417-1) on a thermal cycler Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400. PCR was performed by a single cycle of "94°C for 4 min", 5 cycles of

"94°C for 20 sec, and 72°C for 90 sec", 5 cycles of "94°C for 20 sec, and 70°C for 90 sec", 28 cycles of "94°C for 20 sec, and 68°C for 90 sec", a single cycle of 72°C for 3 min, and was terminated at 4°C. As a result, an amplification product of 2119 bp was obtained.

5 The obtained PCR product was subcloned into pGEM-T Easy vector (Promega #A1360) as in Example 1 (3), and the nucleotide sequence was determined. Recombination of the PCR product into the pGEM-T Easy vector was performed using T4 DNA Ligase (Promega #A1360) in a reaction of 12 hrs at 4°C. The recombinant of the PCR product and the pGEM-T
10 Easy vector was obtained by transformation of DH5 alpha *E. coli* (Toyobo#DNA-903), and Insert Check Ready Blue (TOYOBO #PIK-201) was used for the selection. The nucleotide sequence was determined using the BigDye Terminator Cycle Sequencing SF Ready Reaction Kit (ABI/Perkin Elmer #4303150) and the ABI PRISM 377 DNA Sequencer. The
15 nucleotide sequences of the whole insert fragments from 5 independent clones of the recombinant were determined. As a result, the nucleotide sequence of a cDNA clone that may encode the full length CDS of NR10 including the transmembrane region was determined. However, the determined sequence was not recognized as that of NR10.1, but instead
20 it was a cDNA clone which could encode a transmembrane type of receptor protein of 662 amino acids. The clone was named NR10.3 so as to distinguish it from the NR10.1.

E. coli containing this cDNA clone was deposited in National
Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial
25 Science and Technology.

Depository institution: National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry.

30 Address: 1-1-3 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan.
Deposition date (original date): July 23, 1999 (Heisei 11).
Accession No. Seimeiken Jyouki Dai 6793 Go (FERM BP-6793).

 As compared with NR10.1, the NR10.3 cDNA clone has a single
35 nucleotide deletion in the adenine cluster at the proximity of the stop codon leading to a frame shift. Thereby, NR10.1 and NR10.3 exhibit

difference in the reading frame of the amino acid sequence proximal to the stop codon. The decided nucleotide sequence of NR10.3 and the amino acid sequence encoded by it are shown in SEQ ID NO: 16 and 17, respectively, as well as in Fig. 13 and 14.

5

(3) Significance of the existence of NR10.1 and NR10.3

As described above, the difference between NR10.1 and NR10.3 is caused by the difference of a single nucleotide at a position near the stop codon, and not by different transcription products due to splicing mutants. Since NR10.1 and NR10.3 cDNA clone are identical except for the deletion of the single nucleotide, the hematopoietic factor receptor proteins encoded by them are presumed to be functionally equivalent. However, such single nucleotide deletion or point mutation could play a role in certain disease, or the sequence diversity may be caused family or race dependently.

15

[Example 8] Chromosomal location of the NR10

(1) Design of oligonucleotide primers

In order to construct a chromosome map of NR10, an oligonucleotide primer, NR10-intron, with the following sequence was synthesized. NR10-intron primer was designed as a sense primer (downstream orientation) by selecting the sequence of an intron site, not transcribed into NR10 mRNA, within the sequence of AQ022781 deposited in the gss database. The primer was synthesized as described in Example 1 (2) using an ABI 394 DNA/RNA Synthesizer under condition where a trityl group is attached to the 5'-terminus, and purified on an OPC column (ABI #400771) to obtain a full-length product.

20

25

NR10-intron (SN): 5'-CTG TGT AAG TAC CAA TTG TTC CCA GGC-3' (SEQ ID NO: 20)

30

(2) Chromosome mapping of the NR10 gene

In order to make a chromosome map of NR10, PCR analysis was performed using respective DNA obtained from human/mouse somatic cell system having 24 chromosomes (Dubois B.L. and Naylor S., Genomics 16:315-319 (1993)).

35

NR10-intron primer of Example 8 (1) and NA10-A1 primer produced in Example 1 (2) were used as sense and antisense primers, respectively. PCR experiment was performed using Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech #8417-1) on a thermal cycler Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 under the following PCR condition. As a result, a 359 bp amplification product was amplified, which suggested the existence of NR10 gene on human chromosome 5.

PCR was performed by a single cycle of "94°C for 4 min", 5 cycles of "94°C for 20 sec, and 70°C for 60 sec", 28 cycles of "94°C for 20 sec, and 68°C for 60 sec", and a single cycle of 72°C for 3 min, and was terminated at 4°C.

The obtained PCR product was cloned into pGEM-T Easy vector (Promega #A1360) as described in Example 1 (3), and the nucleotide sequence was determined using an ABI PRISM 337 DNA Sequencer. Analysis of the nucleotide sequence of the whole insert fragment from eight independent recombinant clones confirmed that the PCR product had the nucleotide sequence of the target genomic DNA fragment containing a partial sequence of NR10, and not a product due to non-specific amplification.

The above result also confirmed that the primer set was working in a specific manner. Subsequently, the locus of the NR10 gene was determined using the GeneBridge 4 radiation hybrid panel 93 (Walter et al., Nature Genetics 7:22-28 (1994)). PCR analysis was performed using the GeneBridge 4 radiation hybrid panel 93 as a template and NR10-intron and NR10-A1 primers under the same condition as above. The amount of amplified products from respective hybrids were quantitatively assessed as plus or minus, and the result was converted to binary code. Using the program in the server at [<http://www.carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>], the result was compared with similar codes of gene map marker genes used for constructing frame-work maps, and the location on the chromosome was determined. As a result, NR10 was mapped on chromosome 5 proximal to the centrosome, and was further confirmed that it exists between the markers WI-3071 (60-61 cM) and AFM183YB8 (67 cM).

Human gp130 and LIF receptor genes, which were used in the original database search by the inventors, were also mapped on regions of

chromosome 5. More specifically, the human gp130 gene was mapped on chromosome 5 q11 (67.2-69.6 cM), and human LIF receptor gene was mapped on chromosome 5 p12-p13 (59.9-61.1 cM).

From the point of evolutionary genetics, it is also of great importance that the NR10 gene was mapped to the region 61-67 cM on chromosome 5, a region between the two genes. That is, the three genes, human gp130, human LIF receptor, and human NR10 genes, of the same receptor family, whose structures show relatively high similarity in the family, are located close to each other in an extremely restricted region of the same human chromosome 5. This fact supports the theory that the three different receptor genes are derived from a same ancestral gene, and that they went through genetical evolution during the long history of biological evolution to achieve diversity not only in their structure but also functions.

Industrial Applicability

The present invention provides novel hemopoietin receptor proteins and DNA encoding same. The present invention also provides: a vector into which the DNA has been inserted, a transformant harboring the DNA, and a method for producing recombinant proteins using the transformant. It further provides a method of screening for a compound or a natural ligand that binds to the protein. The protein of the invention is thought to be associated with immunological and hematopoietic functions. Therefore, it is expected that the proteins of this invention can be applied for diagnosis and treatment of diseases related with immunity and hematopoiesis.

As described above, the NR10 gene is expected to provide a useful source for obtaining novel hematopoietic factors or agonists that are capable of functionally binding to the receptor protein encoded by the gene. It is expected that cellular immunity or hematopoietic function *in vivo* will be enhanced by administering such functional binding substances or specific antibodies that can activate the function of NR10 molecule to the organism. Thus, it is possible to develop a drug for clinical application that promotes proliferation or differentiation of the immune responsible cells or hematopoietic cells, or that activates the function of the immune cells by using

the NR10 gene. It is also possible to use such drugs to enhance the cytotoxic immunity against particular types of tumor. It is possible that NR10.1 is expressed in a restricted population of cells in the hematopoietic tissues. Accordingly, anti-NR10 antibodies would be
5 useful for the isolation of such cell populations, which may be used for cell transplantation treatments.

On the other hand, NR10.2, a splice variant of NR10, may be used as an inhibitor for the NR10 ligand, as a decoy type receptor. Further, it is expected that by administering antagonists that can bind
10 functionally to the NR10 molecule, or other inhibitors, as well as specific antibodies that can inhibit the molecular function of NR10 to the organism, it is possible to suppress the cellular immunity or inhibit the proliferation of hematopoietic cells *in vivo*. Thus, it is possible to apply such inhibitors to the development of a drug
15 for clinical application that inhibits the proliferation or differentiation of the immune responsible cells or hematopoietic cells, or suppresses the immune function or inflammation. Specifically, it is possible to use such inhibitors to suppress the onset of autoimmune diseases arising from autoimmunity, or tissue rejection by the immune
20 system of the living body, the primary problem in transplantation. Furthermore, the inhibitors may be effectively used to treat such diseases caused by the abnormally upregulated immune response. Thus, it is possible to use the inhibitors to treat a variety of allergies that are specific to particular antigens, such as metal and pollen.

CLAIMS

1. A DNA selected from the group consisting of:
 - (a) a DNA encoding a protein consisting of the amino acid sequence
5 of any of SEQ ID NOs: 2, 4, and 17;
 - (b) a DNA comprising the coding region of the nucleotide sequence
of any of SEQ ID NOs: 1, 3, and 16;
 - (c) a DNA encoding a protein consisting of the amino acid sequence
of any of SEQ ID NOs: 2, 4, and 17, in which one or more amino acids
10 are modified by deletion, addition and/or substitution by another
amino acid, wherein said protein is functionally equivalent to the
protein consisting of the amino acid sequence of any of SEQ ID NOs:
2, 4, and 17; and
 - (d) a DNA hybridizing under stringent conditions with a DNA
15 consisting of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs: 1, 3,
and 16, and encoding a protein that is functionally equivalent to
the protein consisting of the amino acid sequence of any of SEQ ID
NOs: 2, 4, and 17,.
2. A DNA encoding a partial peptide of a protein consisting of an
20 amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:
2, 4, and 17,
3. A vector into which the DNA described in claim 1 or claim 2 is
inserted.
4. A transformant harboring the DNA described in claim 1 or claim
25 2 in an expressible manner.
5. A protein or peptide that is encoded by the DNA described in claim
1 or claim 2.
6. A method for producing the protein or peptide of claim 5, comprising
the steps of: culturing the transformant of claim 4; and recovering
30 the expressed protein from said transformant or the culture
supernatant.
7. A method of screening for a compound that binds to the protein
of claim 5, comprising the steps of:
 - (a) contacting a sample with the protein of claim 5 or partial
35 peptide thereof;
 - (b) detecting the binding activity of the sample with the protein

of claim 5 or partial peptide thereof; and

(c) selecting the one or more compounds that bind to the protein of claim 5 or partial peptide thereof.

8. An antibody binding to the protein of claim 5.

5 9. A method for detecting or measuring the protein of claim 5, comprising the steps of: exposing the antibody of claim 8 to a sample expected to contain the protein of claim 5; and detecting or measuring the production of the immune complex between said antibody and said protein.

10 10. A polynucleotide complementary to either a DNA that comprises the nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs: 1, 3, and 16 or its complementary strand, wherein the polynucleotide comprises at least 15 nucleotides.

ABSTRACT

The inventors succeeded in isolating a novel hemopoietin receptor gene (NR10) using a sequence predicted from the extracted motif
5 conserved in the amino acid sequences of known hemopoietin receptors. It was expected that two forms of NR10 exists, a transmembrane type and soluble form. Expression of the former type was detected in tissues containing hematopoietic cells. Thus, NR10 is a novel hemopoietin receptor molecule implicated in the regulation of the immune system
10 and hematopoiesis *in vivo*. These novel receptors are useful in screening for novel hematopoietic factors capable of functionally binding to the receptor, or developing medicines to treat diseases related with the immune system or hematopoietic system.

Figure 1

1 ttgggtggttcattggtgatgttctatatctgtgtaagtaccgaattgttccaggcacatata
61 ggaagtgctgtaataaaaaatgatataattttaaaatttgatttagagtggtactagttcta
121 aaaatgtaaaagtacactaggtagtggaagaggaaaatgggaggataaacgtgtggtctcca
181 tttcagtttacgattgtctctgtcctttagatggaagtcgaacttcgctaagaaccgtaaag

MetGluValAsnPheAlaLysAsnArgLys

241 gataaaaaccaaacgtacaacctcacggggctgcaacctttttacagaatatgtcatagct
AspLysAsnGlnThrTyrAsnLeuThrGlyLeuGlnProXxxThrGluTyrValIleAla

301 ctgcgatgtgcgggtcaaggagtgcaaagttctggagtgactggagccaagaaaaaatggga
LeuArgCysAlaValLysGluSerLysPheTrpSerAspTrpSerGlnGluLysMetGly

361 atgactgaggaagaanaagcaagctacttcctgcgattcccgtcctgtctgctctggtgtan
MetThrGluGluGluXxxLysLeuLeuProAlaIlePro

421 ggctgctctgcgctaaacttgggtggtgtctgcaccacgg

Figure 2

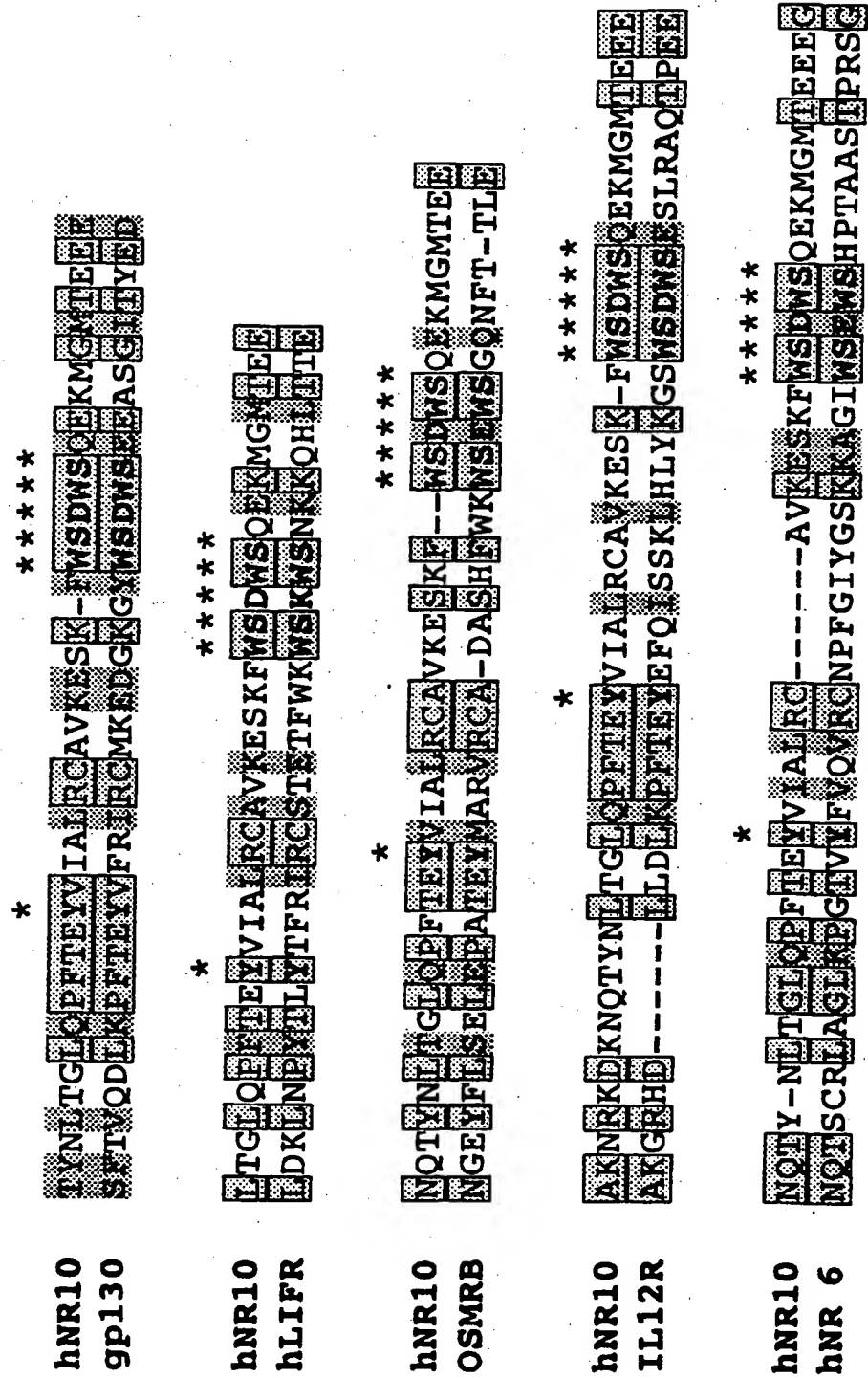


Figure 3

1 CGCTTATAAATGAATGTGTGCTTAGGAACACCAGACAGCACTCCAGCACTCTGCTTGGGG
 61 GGCATTTCGAAACAGCAAAATCACTCATAAAAGGCAAAAAATTGCAAAAAAATAGTAATA
 121 ACCAGCATGGTACTAAATAGACCATGAAAAGACATGTGTGTGCAGTATGAAAATTGAGAC
 181 AGGAAGGCAGAGTGTGAGCTTGTTCACCTCAGCTGGGAATGTGCATCAGGCAACTCAAG
 241 TTTTTCACCACGGCATGTGTCTGTGAATGTCCGCAAAACATTTTAACAATAATGCAATCC
 301 ATTTCCCAGCATAAGTGGGTAAGTGCCACTTTGACTTGGGCTGGGCTTAAAAGCACAAGA
 361 AAAGCTCGCAGACAATCAGAGTGGAAACACTCCACATCTTAGTGTGGATAAAATTAAGT
 421 CCAGATTGTTCTTCTGTCTGACTTGTGTGTGGGAGGTGGAGTTGCCITTTGATGCAAA
 481 TCCTTTGAGCCAGCAGAACATCTGTGGAACATCCCCTGATACATGAAGCTCTCTCCCCAG
 MetLysLeuSerProGln
 541 CCTTCATGTGTTAACCTGGGGATGATGTGGACCTGGGCACTGTGGATGCTCCCCTCACTC
 ProSerCysValAsnLeuGlyMetMetTrpThrTrpAlaLeuTrpMetLeuProSerLeu
 601 TGCAAATTCAGCCTGGCAGCTCTGCCAGCTAAGCCTGAGAACATTTCTGTGTCTACTAC
 CysLysPheSerLeuAlaAlaLeuProAlaLysProGluAsnIleSerCysValTyrTyr
 661 TATAGGAAAAATTTAACCTGCACCTGGAGTCCAGGAAAGGAAACCAGTTATACCCAGTAC
 TyrArgLysAsnLeuThrCysThrTrpSerProGlyLysGluThrSerTyrThrGlnTyr
 721 ACAGTTAAGAGAACTTACGCTTTCGGAGAAAAACATGATAATTGTACAACCAATAGTTCT
 ThrValLysArgThrTyrAlaPheGlyGluLysHisAspAsnCysThrThrAsnSerSer
 781 ACAAGTGAAAATCGTGCTTCGTGCTCTTTTTCTTCCAAGAATAACGATCCCAGATAAT
 ThrSerGluAsnArgAlaSerCysSerPhePheLeuProArgIleThrIleProAspAsn
 841 TATACCATTGAGGTGGAAGCTGAAAATGGAGATGGTGTAAATTAATCTCATATGACATAC
 TyrThrIleGluValGluAlaGluAsnGlyAspGlyValIleLysSerHisMetThrTyr
 901 TGGAGATTAGAGAACATAGCGAAACTGAACCACCTAAGATTTTCCGTGTGAAACCAGTT
 TrpArgLeuGluAsnIleAlaLysThrGluProProLysIlePheArgValLysProVal
 961 TTGGGCATCAAACGAATGATTCAAATTGAATGGATAAAGCCTGAGTTGGCGCTGTTTCA
 LeuGlyIleLysArgMetIleGlnIleGluTrpIleLysProGluLeuAlaProValSer
 1021 TCTGATTTAAAATACACACTTCGATTCAGGACAGTCAACAGTACCAGCTGGATGGAAGTC
 SerAspLeuLysTyrThrLeuArgPheArgThrValAsnSerThrSerTrpMetGluVal
 1081 AACTTCGCTAAGAACCCTAAGGATAAAACCAAACGTACAACCTCACGGGGCTGCAGCCT
 AsnPheAlaLysAsnArgLysAspLysAsnGlnThrTyrAsnLeuThrGlyLeuGlnPro
 1141 TTTACAGAATATGTCATAGCTCTGCGATGTGCGGTCAAGGAGTCAAAGTTCTGGAGTGAC
 PheThrGluTyrValIleAlaLeuArgCysAlaValLysGluSerLysPheTrpSerAsp

Figure 4

1201 TGGAGCCAAGAAAAATGGGAATGACTGAGGAAGAAGCTCCATGTGGCCTGGAAGTGTGG
TrpSerGlnGluLysMetGlyMetThrGluGluGluAlaProCysGlyLeuGluLeuTrp
 1261 AGAGTCCTGAAACCAGCTGAGGCGGATGGAAGAAGGCCAGTGC GGTTGTTATGGAAGAAG
 ArgValLeuLysProAlaGluAlaAspGlyArgArgProValArgLeuLeuTrpLysLys
 1321 GCAAGAGGAGCCCCAGTCCTAGAGAAAACACTTGGCTACAACATATGGTACTATCCAGAA
 AlaArgGlyAlaProValLeuGluLysThrLeuGlyTyrAsnIleTrpTyrTyrProGlu
 1381 AGCAACACTAACCTCACAGAAACATGAACACTACTAACCAGCAGCTTGAAGTGCATCTG
 SerAsnThrAsnLeuThrGluThrMetAsnThrThrAsnGlnGlnLeuGluLeuHisLeu
 1441 GGAGGCGAGAGCTTTTGGGTGTCTATGATTTCTTATAATTCTCTGGGAAGTCTCCAGTG
 GlyGlyGluSerPheTrpValSerMetIleSerTyrAsnSerLeuGlyLysSerProVal
 1501 GCCACCCTGAGGATTCCAGCTATTCAAGAAAAATCATTTCAGTGCATTGAGGTCATGCAG
 AlaThrLeuArgIleProAlaIleGlnGluLysSerPheGlnCysIleGluValMetGln
 1561 GCCTGCGTTGCTGAGGACCAGCTAGTGGTGAAGTGGCAAAGCTCTGCTCTAGACGTGAAC
 AlaCysValAlaGluAspGlnLeuValValLysTrpGlnSerSerAlaLeuAspValAsn
 1621 ACTTGGATGATTGAATGGTTTCCGGATGTGGACTCAGAGCCCACCACCTTTCTGGGAA
 ThrTrpMetIleGluTrpPheProAspValAspSerGluProThrThrLeuSerTrpGlu
 1681 TCTGTGTCTCAGGCCACGAAGTGCACGATCCAGCAAGATAAATTAACCTTTCTGGTGC
 SerValSerGlnAlaThrAsnTrpThrIleGlnGlnAspLysLeuLysProPheTrpCys
 1741 TATAACATCTCTGTGTATCCAATGTTGCATGACAAAGTGGCGAGCCATATCCATCCAG
 TyrAsnIleSerValTyrProMetLeuHisAspLysValGlyGluProTyrSerIleGln
 1801 GCTTATGCCAAGAAGGCGTTCCATCAGAAGGTCTGAGACCAAGGTGGAGAACATTGGC
 AlaTyrAlaLysGluGlyValProSerGluGlyProGluThrLysValGluAsnIleGly
 1861 GTGAAGACGGTCACGATCACATGGAAGAGATTCCCAAGAGTGAGAGAAAGGTATCATC
 ValLysThrValThrIleThrTrpLysGluIleProLysSerGluArgLysGlyIleIle
 1921 TGCAACTACACCATCTTTTACCAAGCTGAAGGTGGAAGGATTCTCCAAGACAGTCAAT
 CysAsnTyrThrIlePheTyrGlnAlaGluGlyGlyLysGlyPheSerLysThrValAsn
 1981 TCCAGCATCTTGCACTACGGCTGGAGTCCCTGAAACGAAAGACCTTACATGTGTTAG
 SerSerIleLeuGlnTyrGlyLeuGluSerLeuLysArgLysThrSerTyrIleValGln
 2041 GTCATGGCCAACACCAAGTGTGGGGGAACCAACGGGACCAGCATAAATTTCAAGACATTG
 ValMetAlaAsnThrSerAlaGlyGlyThrAsnGlyThrSerIleAsnPheLysThrLeu
 2101 TCATTCAGTGTCTTTGAGATTATCCTCATAACTTCTCTGATTGGTGGAGGCCTTCTTATT
 SerPheSerValPheGluIleIleLeuIleThrSerLeuIleGlyGlyGlyLeuLeuIle

Figure 5

2161 CTCATTATCCTGACAGTGGCATATGGTCTCAAAAAACCCAACAAATTGACTCATCTGTGT
~~LeuIleIleLeuThrValAlaTyrGlyLeu~~LysLysProAsnLysLeuThrHisLeuCys
 2221 TGGCCCAACCGTCCCAACCCTGCTGAAAGTAGTATAGCCACATGGCATGGAGATGATTTCT
 TrpProThrValProAsnProAlaGluSerSerIleAlaThrTrpHisGlyAspAspPhe
 2281 AAGGATAAGCTAAACCTGAAGGAGTCTGATGACTCTGTGAACACAGAAGACAGGATCTTA
 LysAspLysLeuAsnLeuLysGluSerAspAspSerValAsnThrGluAspArgIleLeu
 2341 AAACCATGTTCCACCCCCAGTGACAAGTTGGTGATTGACAAGTTGGTGGTGAACCTTTGGG
 LysProCysSerThrProSerAspLysLeuValIleAspLysLeuValValAsnPheGly
 2401 AATGTTCTGCAAGAAATTTTCACAGATGAAGCCAGAACGGGTGAGGAAAAACAATTTAGG
 AsnValLeuGlnGluIlePheThrAspGluAlaArgThrGlyGlnGluLysGlnPheArg
 2461 AGGGGAAAAGAATGGGACTAGAATTCTGTCTTCCTGCCCAACTTCAATATAAGTGTGGAC
 ArgGlyLysGluTrpAsp***
 2521 TAAATGCGAGAAAGGTGTCTGTGGTCTATGCAAATTAGAAAGGACATGCAGAGTTTTCT
 2581 CAACTAGGAAGACTGAATCTGTGGCCCCAAGAGAACCATCTCCGAAGACTGGGTATGTGG
 2641 TCTTTTCCACACATGGACCACCTACGGATGCAATCTGTAATGCATGTGCATGAGAAGTCT
 2701 GTTATTAAGTAGAGTGTGAAAACATGGTTATGGTAATAGGAACAGCTTTTAAATGCTTT
 2761 TGTATTTGGGCCTTTTCACACAAAAAAGCCATAATACCATTTTCATGTAATGCTATACTTC
 2821 TATACTATTTTCATGTAATACTATACTTCTATACTATTTTCATGTAATACTATACTTCTA
 2881 TACTATTTTCATGTAATACTATACTTCTATATTAAGTTTTACCCACTCCAAAAAAGAA
 2941 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 6

1 CGCTTATAAATGAATGTGTGCTTAGGAACACCAGACAGCACTCCAGCACTCTGCTTGGGG
 61 GGCATTGAAACAGCAAAATCACTCATAAAGGCAAAAAATTGCAAAAAAATAGTAATA
 121 ACCAGCATGGTACTAAATAGACCATGAAAAGACATGTGTGTGCAGTATGAAAATTGAGAC
 181 AGGAAGGCAGAGTGTTCAGCTTGTTCCACCTCAGCTGGGAATGTGCATCAGGCAACTCAAG
 241 TTTTTCACCACGGCATGTGTCTGTGAATGTCCGAAAACATTTTAAACAATAATGCAATCC
 301 ATTTCCCAGCATAAGTGGGTAAAGTGCCACTTTGACTTGGGCTGGGCTTAAAGCACAAGA
 361 AAAGCTCGCAGACAATCAGAGTGGAAACACTCCACATCTTAGTGTGGATAAAATTAAAGT
 421 CCAGATTGTTCTTCTGTCTGACTTGTGTGTGGGAGGTGGAGTTGCCCTTTGATGCAAA
 481 TCCTTTGAGCCAGCAGAACATCTGTGGAACATCCCCTGATACATGAAGCTCTCTCCCCAG
 MetLysLeuSerProGln
 541 CCTTCATGTGTTAACCTGGGGATGATGTGGACCTGGGCACTGTGGATGCTCCCCCTCACTC
 ProSerCysValAsnLeuGlyMetMetTrpThrTrpAlaLeuTrpMetLeuProSerLeu
 601 TGCAAATTCAGCCTGGCAGCTCTGCCAGCTAAGCCTGAGAACATTTCCTGTGTCTACTAC
 CysLysPheSerLeuAlaAlaLeuProAlaLysProGluAsnIleSerCysValTyrTyr
 661 TATAGGAAAAATTTAACCTGCACTTGGAGTCCAGGAAAGGAAACCAGTTATACCCAGTAC
 TyrArgLysAsnLeuThrCysThrTrpSerProGlyLysGluThrSerTyrThrGlnTyr
 721 ACAGTTAAGAGAACTTACGCTTTCGGAGAAAAACATGATAATTGTACAACCAATAGTTCT
 ThrValLysArgThrTyrAlaPheGlyGluLysHisAspAsnCysThrThrAsnSerSer
 781 ACAAGTGAAAATCGTGCTTCGTGCTCTTTTTTCTTCCAAGAATAACGATCCCAGATAAT
 ThrSerGluAsnArgAlaSerCysSerPhePheLeuProArgIleThrIleProAspAsn
 841 TATACCATTGAGGTGGAAGCTGAAAATGGAGATGGTGTAAATTAATCTCATATGACATAC
 TyrThrIleGluValGluAlaGluAsnGlyAspGlyValIleLysSerHisMetThrTyr
 901 TGGAGATTAGAGAACATAGCGAAAACCTGAACCACCTAAGATTTTCCGTGTGAAACAGTT
 TrpArgLeuGluAsnIleAlaLysThrGluProProLysIlePheArgValLysProVal
 961 TTGGGCATCAAACGAATGATTCAAATTGAATGGATAAAGCCTGAGTTGGCGCCTGTTTCA
 LeuGlyIleLysArgMetIleGlnIleGluTrpIleLysProGluLeuAlaProValSer
 1021 TCTGATTTAAATACACACTTCGATTGAGGACAGTCAACAGTACCAGCTGGATGGAAGTC
 SerAspLeuLysTyrThrLeuArgPheArgThrValAsnSerThrSerTrpMetGluVal
 1081 AACTTCGCTAAGAACCGTAAGGATAAAAACCAACGTACAACCTCACGGGGCTGCAGCCT
 AsnPheAlaLysAsnArgLysAspLysAsnGlnThrTyrAsnLeuThrGlyLeuGlnPro
 1141 TTTACAGAATATGTCATAGCTCTGCGATGTGCGGTCAAGGAGTCAAAGTTCTGGAGTGAC
 PheThrGluTyrValIleAlaLeuArgCysAlaValLysGluSerLysPheTrpSerAsp

Figure 7

1201 TGGAGCCAAGAAAAAATGGGAATGACTGAGGAAGAAGGCAAGCTACTCCCTGCGATTCCC
 TrpSerGlnGluLysMetGlyMetThrGluGluGluGlyLysLeuLeuProAlaIlePro
 1261 GTCCTGTCTACTCTGGTGTAGGGCTGCTTTGGGCTAGACTTGGTGGGGTTTGTCAACCACC
 ValLeuSerThrLeuVal***
 1321 TGGTTGGGAATCATGGAATCTCATGACCCAGGGGCCCCCTGTACCATCGAGAGTGAGCC
 1381 TGCACAACCTTTGTGCCCCAAAGGCAAAGGATCACATTTTAATACTCATGAGGTTCTTATA
 1441 CTATACATGAAAGGTATCATATCATTGTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAGATGGAGTC
 1501 TTA CTCTGTCAACCAGGATGGAGTGCAGTGTATGTATCTCGGCTCACTGCCACCACCACC
 1561 TCCCGAGTTC AAGCAATTCTTGTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAGGGGCCCC
 1621 ACGACCATGCCCGGTTGATTTTTGTATTTTTAGTAGAGAAGGGATATCACCATGTTGGCT
 1681 AGGCTAGTCTTGAACTCCTGACCTCAGGTAATCTGCCACCTTGACCTCCCAAAGTGTG
 1741 GGATTACAGGCGTGAGCCACTGTGCCCCGCCAGTATCATATCATCTGAAGGTATCCTGTG
 1801 ATAAATTAAAGATACATATTGTGAATCCTGGAGCTACTACTCAAAAAATAAATAAGGTG
 1861 TAACTAATACAATTAAAAAATCACATTTTTAATGACAGTGAGGAAAGGAAAGAGGCATG
 1921 GATTGCAGGTTGATGGAGTGCTTACTAAGTGTCAATGATGGTCATTAAGAGCAACGCTTCC
 1981 AGTCAGTGGCCTTGGCTTAAATCCCAAGCCAGGTGTCTTTGGGCAAGATACCTAAACTCT
 2041 CAGTTCATTCTCAGCAGTTTCCTCGCATTATTTCCCTTTTCTATATTGAAATAGAATAT
 2101 GTAAGTTGAGTTTATAGTAGTACCTATTTTTTAGTATTATTTTAAAGATTAAATGAAATA
 2161 ATGTGTTTAGCCCATAGTAGATATTTCACTAACTGCTAGACTTCCTATTCTTATTATTTAT
 2221 CCTCCTACTATTATTTTTAATCCTCCTTAAAGCACTATAAAATATGTAGAGTCACTCCCA
 2281 TTTTGGAATGAGGAACTGAGTTTCAGAGATGCTAATAAACAGCTCAGGGTCACTCAGC
 2341 ATGTGTTACTTTTCTCAAGAGCCTTGCCAGAGTCTGACCCTCAGTGGACGATCAATAAA
 2401 TGTGTGATGAATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 8

fetal thymus
fetal spleen
fetal skeletal muscle
fetal lung
fetal liver
fetal spleen
fetal heart
fetal brain
fetal small intestine
fetal colon
ovary
testis
prostate
pancreas
kidney
skeletal muscle
liver
lung
placenta
brain
heart
tonsil
fetal liver
bone marrow
peripheral leukocyte
thymus
lymph node
spleen

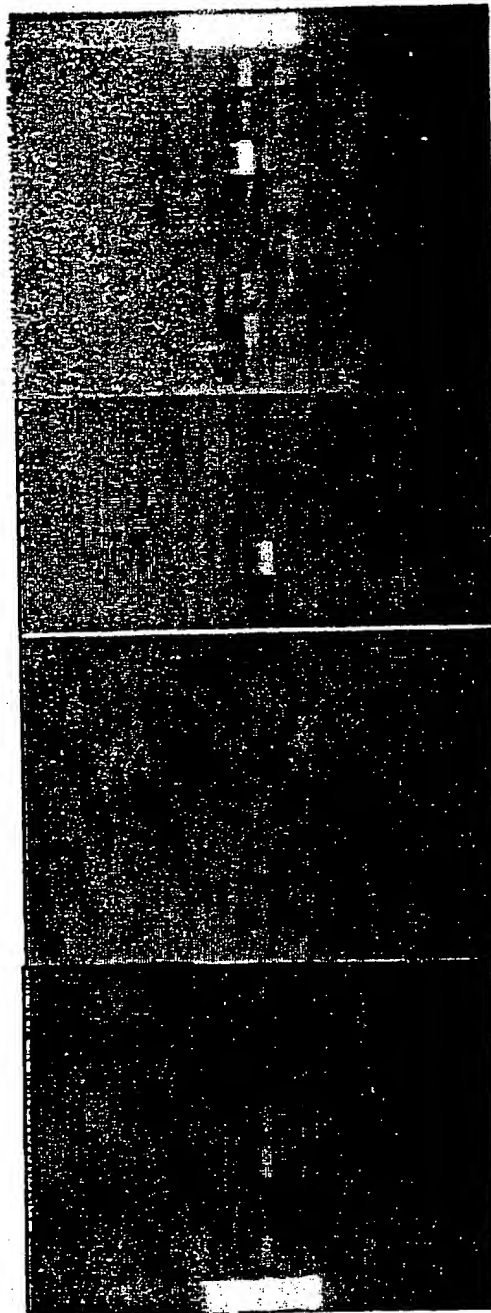


Figure 9

fetal thymus
fetal spleen
fetal skeletal muscle
fetal lung
fetal liver
fetal spleen
fetal heart
fetal brain
fetal small intestine
fetal colon
ovary
testis
prostate
pancreas
kidney
skeletal muscle
liver
lung
placenta
brain
heart
tonsil
fetal liver
bone marrow
peripheral leukocyte
thymus
lymph node
spleen

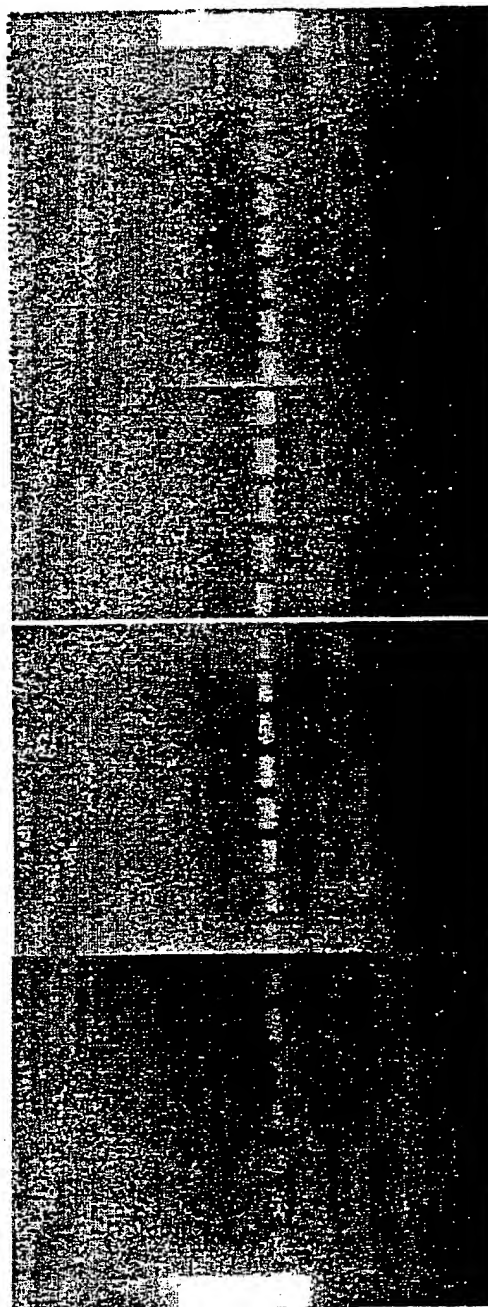


Figure 10

fetal thymus
fetal spleen
fetal skeletal muscle
fetal lung
fetal liver
fetal spleen
fetal heart
fetal brain
fetal small intestine
fetal colon
ovary
testis
prostate
pancreas
kidney
skeletal muscle
liver
lung
placenta
brain
heart
tonsil
fetal liver
bone marrow
peripheral leukocyte
thymus
lymph node
spleen



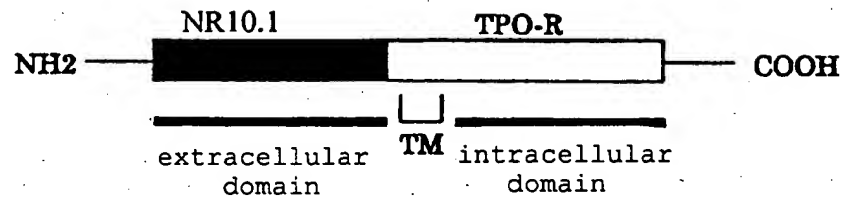
Figure 11

fetal thymus
fetal spleen
fetal skeletal muscle
fetal lung
fetal liver
fetal spleen
fetal heart
fetal brain
fetal small intestine
fetal colon
ovary
testis
prostate
pancreas
kidney
skeletal muscle
liver
lung
placenta
brain
heart
tonsil
fetal liver
bone marrow
peripheral leukocyte
thymus
lymph node
spleen

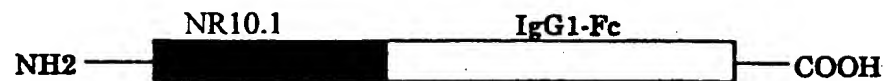


Figure 12

pEF-NR10/TPO-R



pET-NR10/IgG-Fc



pEF-BOS/NR10.2FLAG

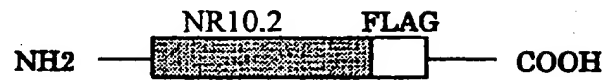


Figure 13

1 CCCCTGATACATGAAGCTCTCTCCCCAGCCTTCATGTGTTAACCTGGGGATGATGTGGAC
 MetLysLeuSerProGlnProSerCysValAsnLeuGlyMetMetTrpThr
 61 CTGGGCACTGTGGATGCTCCCTCACTCTGCAAATTCAGCCTGGCAGCTCTGCCAGCTAA
 TrpAlaLeuTrpMetLeuProSerLeuCysLysPheSerLeuAlaAlaLeuProAlaLys
 121 GCCTGAGAACATTTCTGTGTCTACTACTATAGGAAAAATTTAACCTGCACCTGGAGTCC
 ProGluAsnIleSerCysValTyrTyrTyrArgLysAsnLeuThrCysThrTrpSerPro
 181 AGGAAAGGAAACCAGTTATACCCAGTACACAGTTAAGAGAACTTACGCTTTTGGAGAAAA
 GlyLysGluThrSerTyrThrGlnTyrThrValLysArgThrTyrAlaPheGlyGluLys
 241 ACATGATAATTGTACAACCAATAGTTCTACAAGTGAAATCGTGCTTCGTCTCTTTTTT
 HisAspAsnCysThrThrAsnSerSerThrSerGluAsnArgAlaSerCysSerPhePhe
 301 CCTTCCAAGAATAACGATCCAGATAATTATACATTGAGGTGGAAGCTGAAAATGGAGA
 LeuProArgIleThrIleProAspAsnTyrThrIleGluValGluAlaGluAsnGlyAsp
 361 TGGTGTAATTAAATCTCATATGACATACTGGAGATTAGAGAACATAGCGAAAACCTGAACC
 GlyValIleLysSerHisMetThrTyrTrpArgLeuGluAsnIleAlaLysThrGluPro
 421 ACCTAAGATTTTCCGTGTGAACCACTTTTGGGCATCAAACGAATGATTCAAATTGAATG
 ProLysIlePheArgValLysProValLeuGlyIleLysArgMetIleGlnIleGluTrp
 481 GATAAAGCCTGAGTTGGCGCCTGTTTCATCTGATTTAAATACACACTTCGATTACAGAC
 IleLysProGluLeuAlaProValSerSerAspLeuLysTyrThrLeuArgPheArgThr
 541 AGTCAACAGTACCAGCTGGATGGAAGTCAACTTCGCTAAGAACCGTAAGGATAAAACCA
 ValAsnSerThrSerTrpMetGluValAsnPheAlaLysAsnArgLysAspLysAsnGln
 601 AACGTACAACCTCACGGGGCTGCAGCCTTTTACAGAATATGTCATAGCTCTGCGATGTGC
 ThrTyrAsnLeuThrGlyLeuGlnProPheThrGluTyrValIleAlaLeuArgCysAla
 661 GGTCAAGGAGTCAAAGTTCTGGAGTGAAGTGGAGCCAAGAAAAATGGGAATGACTGAGGA
 ValLysGluSerLysPheTrpSerAspTrpSerGlnGluLysMetGlyMetThrGluGlu
 721 AGAAGCTCCATGTGGCCTGGAAGTGTGGAGAGTCCTGAAACCAGCTGAGGCGGATGGAAG
 GluAlaProCysGlyLeuGluLeuTrpArgValLeuLysProAlaGluAlaAspGlyArg
 781 AAGGCCAGTGCAGTTGTTATGGAAGAAGGCAAGAGGAGCCCCAGTCTAGAGAAAACACT
 ArgProValArgLeuLeuTrpLysLysAlaArgGlyAlaProValLeuGluLysThrLeu
 841 TGGCTACAACATATGGTACTATCCAGAAAGCAACACTAACCTCACAGAAACAATGAACAC
 GlyTyrAsnIleTrpTyrTyrProGluSerAsnThrAsnLeuThrGluThrMetAsnThr
 901 TACTAACCAGCAGCTTGAACTGCATCTGGGAGGCGAGAGCTTTTGGGTGTCTATGATTTCT
 ThrAsnGlnGlnLeuGluLeuHisLeuGlyGlyGluSerPheTrpValSerMetIleSer
 961 TTATAATTCTCTGGGAAGTCTCCAGTGGCCACCCTGAGGATTCCAGCTATTCAAGAAAA
 TyrAsnSerLeuGlyLysSerProValAlaThrLeuArgIleProAlaIleGlnGluLys
 1021 ATCATTTCAGTGCATTGAGGTATGCAGGCCTGCGTTGCTGAGGACCAGCTAGTGGTGAA

Figure 14

SerPheGlnCysIleGluValMetGlnAlaCysValAlaGluAspGlnLeuValValLys
 1081 GTGGCAAAGCTCTGCTCTAGACGTGAACACTTGGATGATTGAATGGTTTCCGGATGTGGA
 TrpGlnSerSerAlaLeuAspValAsnThrTrpMetIleGluTrpPheProAspValAsp
 1141 CTCAGAGCCCACCACCTTTCTGGGAATCTGTGTCTCAGGCCACGAACTGGACGATCCA
 SerGluProThrThrLeuSerTrpGluSerValSerGlnAlaThrAsnTrpThrIleGln
 1201 GCAAGATAAATTAAACCTTTCTGGTGCTATAACATCTCTGTGTATCCAATGTTGCATGA
 GlnAspLysLeuLysProPheTrpCysTyrAsnIleSerValTyrProMetLeuHisAsp
 1261 CAAAGTTGGCGAGCCATATTCCATCCAGGCTTATGCCAAAGAAGGCGTTCATCAGAAGG
 LysValGlyGluProTyrSerIleGlnAlaTyrAlaLysGluGlyValProSerGluGly
 1321 TCCTGAGACCAAGGTGGAGAACATTGGCGTGAAGACGGTCACGATCACATGGAAAGAGAT
 ProGluThrLysValGluAsnIleGlyValLysThrValThrIleThrTrpLysGluIle
 1381 TCCCAAGAGTGAGAGAAAGGGTATCATCTGCAACTACACCATCTTTTACCAAGCTGAAGG
 ProLysSerGluArgLysGlyIleIleCysAsnTyrThrIlePheTyrGlnAlaGluGly
 1441 TGGAAAAGGATTCTCCAAGACAGTCAATTCCAGCATCTTGCAGTACGGCCTGGAGTCCCT
 GlyLysGlyPheSerLysThrValAsnSerSerIleLeuGlnTyrGlyLeuGluSerLeu
 1501 GAAACGAAAGACCTCTTACATTGTTTCAGGTCATGGCCAGCACCAGTCTGGGGGAACCAA
 LysArgLysThrSerTyrIleValGlnValMetAlaSerThrSerAlaGlyGlyThrAsn
 1561 CGGGACCAGCATAAATTCAAGACATTGTCATTCAAGTGTCTTTGAGATTATCCTCATAAC
 GlyThrSerIleAsnPheLysThrLeuSerPheSerValPheGluIleIleLeuIleThr
 1621 TTCTCTGATTGGTGGAGGCCTTCTTATTCTCATTATCCTGACAGTGGCATATGGTCTCAA
 SerLeuIleGlyGlyGlyLeuLeuIleLeuIleIleLeuThrValAlaTyrGlyLeuLys
 1681 AAAACCCAAACAAATTGACTCATCTGTGTGGCCACCGTTCCCAACCTGCTGAAAGTAG
 LysProAsnLysLeuThrHisLeuCysTrpProThrValProAsnProAlaGluSerSer
 1741 TATAGCCACATGGCATGGAGATGATTTCAAGGATAAGCTAAACCTGAAGGAGTCTGATGA
 IleAlaThrTrpHisGlyAspAspPheLysAspLysLeuAsnLeuLysGluSerAspAsp
 1801 CTCTGTGAACACAGAAGACAGGATCTTAAACCATGTTCCACCCCCAGTGACAAGTTGGT
 SerValAsnThrGluAspArgIleLeuLysProCysSerThrProSerAspLysLeuVal
 1861 GATTGACAAGTTGGTGGTGAACCTTTGGGAATGTTCTGCAAGAAATTTTCACAGATGAAGC
 IleAspLysLeuValValAsnPheGlyAsnValLeuGlnGluIlePheThrAspGluAla
 1921 CAGAACGGGTCAGGAAAACAATTTAGGAGGGGAAAAGAATGGGACTAGAATTCTGTCTTC
 ArgThrGlyGlnGluAsnAsnLeuGlyGlyGluLysAsnGlyThrArgIleLeuSerSer
 1981 CTGCCCAACTTCAATATAAGTGTGGACTAAAATGCGAGAAAGGTGTCCTGTGGTCTATGC
 CysProThrSerIle***
 2041 AAATTAGAAAGGACATGCAGAGTTTTCCAACCTAGGAAGACTGAATCTGTGCCCCCAAGAG
 2101 AACCATCTCCGAAGACTGG